

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Hana Šmejkalová

VELKOPLOŠNÁ UHLÍKOVÁ FILMOVÁ ELEKTRODA –  
NOVÝ SENZOR PRO VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ  
ELEKTROCHEMICKY OXIDOVATELNÝCH  
ORGANICKÝCH SLOUČENIN

Large-Surface Carbon Film Electrode – A Novel Sensor for  
Voltammetric Determination of Electrochemically  
Oxidizable Organic Compounds

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2013

Tato diplomová práce vznikla v rámci Univerzitního výzkumného centra UNCE 204018/304018/2012 v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM 0021620857. Poděkování za její finanční podporu patří Grantové agentuře České republiky (projekt GP13-23337P).

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 13. května 2013

## **Poděkování**

V úvodu bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky k mé práci, dále pak i ostatním členům Katedry analytické chemie za pomoc a ochotu.

Mé poděkování patří též rodičům, kteří mi umožnili studium na vysoké škole, a mým přátelům za všestrannou podporu.

## Abstrakt diplomové práce

V této práci bylo studováno elektrochemické chování 4-nitrofenolu (4-NP) na nově připravené velkoplošné uhlíkové filmové elektrodě (ls-CFE) pomocí technik DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) s cílem vyvinout citlivé analytické metody pro jeho stanovení. Voltametrické chování 4-NP bylo sledováno v anodické oblasti potenciálů v závislosti na pH prostředí (realizováno užitím Brittonova-Robinsonova pufru). Jako optimální pH pro stanovení 4-NP bylo vybráno pH 3,0 (pro techniku DCV) a pH 7,0 (pro techniku DPV). Při anodické oxidaci 4-NP na ls-CFE při koncentraci analytu  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l docházelo k pasivaci elektrodového povrchu, proto bylo přistoupeno k měřením jednotlivých sérií záznamů vždy na novém uhlíkovém filmu.

Na vzorku 4-NP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l byla testována opakovatelnost nanášení filmů, která nabývala hodnoty 3,7 % pro DCV a 3,6 % pro DPV. Kalibrační závislosti 4-NP byly proměřeny za zvolených optimálních podmínek v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l s dosaženými mezemi stanovitelnosti ( $L_Q$ )  $1,5 \cdot 10^{-6}$  mol/l (pro DCV na ls-CFE) a  $4,6 \cdot 10^{-7}$  mol/l (pro DPV na ls-CFE). Aplikovatelnost nově vyvinutých metod stanovení 4-NP byla ověřena na modelových vzorcích pitné a říční vody a byly získány řádově stejné  $L_Q$  jako ve vzorcích deionizované vody.

Dále byly zjištěny optimální podmínky pro použití předřazené prekoncentrace analytu pomocí extrakce na tuhou fázi (SPE) s následným měřením DP voltamogramů 4-NP na ls-CFE s dosaženou  $L_Q$   $1,4 \cdot 10^{-8}$  mol/l při SPE ze 100 ml původního vzorku do 1 ml měřeného vzorku. Aplikovatelnost této metodiky byla ověřena na modelových vzorcích pitné a říční vody, ve kterých bylo ve všech případech dosaženo  $L_Q$  řádově  $10^{-8}$  mol/l. Výtěžnost 4-NP po SPE z deionizované vody nabývala hodnot přes 97 % a i v říční vodě přesahovala 95 %, což je výrazně lepší výsledek než u většiny prací zabývajících se touto problematikou.

Elektrochemická přeměna 4-NP byla sledována pomocí cyklické voltametrie (CV) na ls-CFE v kyselém, neutrálním a zásaditém prostředí.

## Abstract of the Diploma Thesis

In this Diploma Thesis, the electrochemical behavior of 4-nitrophenol (4-NP) was studied at a newly prepared large-surface carbon film electrode (ls-CFE) using techniques of DC voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) with the aim to develop sensitive analytical methods for its determination. Voltammetric behavior of 4-NP was investigated in the region of anodic potentials, in dependence on the pH of the medium used (realized using Britton-Robinson buffer). The optimum pH values for the determination of 4-NP were chosen as follows: pH 3.0 (for DCV) and pH 7.0 (for DPV). During anodic oxidation of 4-NP on the ls-CFE at the concentration of the analyte of  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l, the passivation of the electrode surface occurred. Thus, it was decided to record series of measurements always at a new carbon film.

Using the sample of 4-NP (at the concentration of  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l), the repeatability of the application of individual carbon films was tested, with obtained *RSD* values of 3.7% and 3.6% for DCV and DPV, respectively. Under optimum conditions, the calibration dependences of 4-NP were measured in the concentration range from  $1 \cdot 10^{-6}$  to  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l, with the limits of quantification ( $L_{QS}$ ) of  $1.5 \cdot 10^{-6}$  mol/l (for DCV at the ls-CFE) and  $4.6 \cdot 10^{-7}$  mol/l (for DPV at the ls-CFE). The applicability of the newly developed methods for the determination of 4-NP was verified on model samples of drinking and river water. The  $L_{QS}$  thereby obtained were of the same concentration order as those in the samples of deionized water.

Furthermore, the optimum conditions were found for the use of preliminary preconcentration of the analyte by a solid phase extraction (SPE) with subsequent measurement of DP voltamograms of 4-NP at the ls-CFE; the  $L_Q$  thus achieved was of  $1.4 \cdot 10^{-8}$  mol/l at the SPE from 100 ml of the original sample to 1 ml of the measured sample. The applicability of this methodology was tested on the model samples of drinking and river water, in which the  $L_{QS}$  achieved were in all cases in the order of  $10^{-8}$  mol/l. The yield of 4-NP after the SPE from deionized water was over 97% and, even in the model samples of river water, it was more than 95%, which is the yield significantly higher than in the majority of papers dealing with this topic.

The electrochemical conversion of 4-NP was studied using cyclic voltammetry (CV) at the ls-CFE in acidic, neutral and alkaline media.

**Předmětová hesla:**

analytická chemie  
elektrochemie  
voltametrie

**Klíčová slova:**

velkoplošná uhlíková filmová elektroda  
4-nitrofenol  
DC voltametrie  
diferenční pulzní voltametrie  
cyklická voltametrie  
extrakce tuhou fází  
pitná a říční voda

---

**Objective Words:**

Analytical Chemistry  
Electrochemistry  
Voltammetry

**Key Words:**

Large-Surface Carbon Film Electrode  
4-Nitrophenol  
DC Voltammetry  
Differential Pulse Voltammetry  
Cyclic Voltammetry  
Solid Phase Extraction  
Drinking and River Water

## Seznam použitých zkratk

2-NP	2-nitrofenol
4-NP	4-nitrofenol
$A$	plocha elektrody [ $\text{cm}^2$ ]
AdSV	adsorpční rozpouštěcí voltametrie
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
$c$	molární koncentrace [ $\text{mol/l}$ ]
CAS	Chemical Abstract Service
CSE	pevná kompozitní elektroda
CV	cyklická voltametrie
$D$	difuzní koeficient [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ]
DCV	DC voltametrie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
$E$	potenciál [ $\text{mV}$ ]
$E_p$	potenciál píku [ $\text{mV}$ ]
$E_{p,a}$	potenciál anodického píku [ $\text{mV}$ ]
$E_{p,k}$	potenciál katodického píku [ $\text{mV}$ ]
$I$	proud [ $\text{A}$ ]
$I_p$	proud píku [ $\text{A}$ ]
$I_{p,0}$	proud píku slepého vzorku [ $\text{A}$ ]
$I_{p,a}$	proud anodického píku [ $\text{A}$ ]
$I_{p,k}$	proud katodického píku [ $\text{A}$ ]
$k_{\text{teor}}$	teoretický prekoncentrační faktor extrakce tuhou fází
$L_D$	mez detekce [ $\text{mol/l}$ ]
$L_Q$	mez stanovitelnosti [ $\text{mol/l}$ ]
ls-CFE	velkoplošná uhlíková filmová elektroda
$M$	molární hmotnost [ $\text{g/mol}$ ]
$n$	počet měření
$n_i$	pořadové číslo měřeného filmu
$n_{\text{el}}$	počet vyměňovaných elektronů
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů

$p_n$	( $n = 1-4$ ) označení píků
$R$	korelační koeficient
$s_r$	relativní směrodatná odchylka [%]
SEM	skenovací elektronový mikroskop
SPE	extrakce tuhou fází
$v$	rychlost polarizace [mV/s]



# Obsah

<b>1 Teoretický úvod</b>	10
1.1 Shrnutí předchozí bakalářské práce	10
1.2 Cíle práce	11
1.3 Studovaná látka – 4-nitrofenol	12
1.3.1 Vlastnosti 4-nitrofenolu	12
1.3.2 Elektrochemické metody stanovení 4-nitrofenolu	13
1.4 Použité voltametrické techniky	14
1.5 Kompozitní elektrody	16
1.5.1 Klasifikace pevných kompozitních elektrod	17
1.5.2 Elektrody na bázi uhlíku	18
1.5.3 Velkoplošná uhlíková filmová elektroda	19
<b>2 Experimentální část</b>	21
2.1 Reagencie	21
2.2 Aparatura	22
2.3 Použitá pracovní elektroda	23
2.4 Pracovní postupy	24
<b>3 Voltametrické stanovení 4-nitrofenolu na ls-CFE</b>	26
3.1 Kompletace tématu bakalářské práce	26
3.2 Stanovení 4-NP v anodické oblasti potenciálového okna	29
3.2.1 Zjištění optimálního pH	29
3.2.2 Opakovatelnost měření a nanášení uhlíkových filmů	33
3.2.3 Koncentrační závislost	35
3.2.4 Koncentrační závislost v modelových vzorcích pitné vody	38
3.2.5 Koncentrační závislost v modelových vzorcích říční vody	40
<b>4 Předběžná separace a prekoncentrace analytu pomocí extrakce tuhou fází</b>	43
4.1 Optimalizace podmínek pro extrakci tuhou fází	44
4.2 Stanovení 4-nitrofenolu po extrakci tuhou fází	47
4.2.1 Extrakce 4-NP z deionizované vody s DPV stanovením	47
4.2.2 Extrakce 4-NP z deionizované vody s DCV stanovením	49
4.2.3 Extrakce 4-NP z modelových vzorků pitné a říční vody	50
<b>5 Charakterizace pracovní elektrody</b>	54
5.1 Použitelnost pracovní elektrody v závislosti na rozsahu pH	54
5.2 Fotografie povrchu ls-CFE zhotovené pomocí elektronového mikroskopu	57
5.3 Cyklická voltametrie	59
5.3.1 Výpočet aktivní plochy ls-CFE pomocí CV	59
5.3.2 Studování mechanismu elektrochemické přeměny 4-NP na ls-CFE	64
<b>6 Shrnutí výsledků a závěr</b>	69
<b>7 Literatura</b>	72

# 1 TEORETICKÝ ÚVOD

## 1.1 Shrnutí předchozí bakalářské práce

Tato diplomová práce navazuje na předchozí bakalářskou práci s názvem „Voltametrické stanovení 4-nitrofenolu na velkoplošné uhlíkové filmové elektrodě“, která pojednávala o výzkumu voltametrického chování 4-nitrofenolu (4-NP) na nově vyvinuté velkoplošné uhlíkové filmové elektrodě (ls-CFE) pomocí technik DC voltametrie (DCV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV). Cílem bakalářské práce bylo nalézt optimální podmínky pro voltametrické stanovení 4-NP v katodické oblasti potenciálového okna, dosažení co nejnižších mezí stanovitelnosti ( $L_Q$ ) a ověření použitelnosti elektrody v modelových vzorcích pitné vody.

Nejprve byl sledován vliv pH na voltametrické chování 4-NP na ls-CFE v prostředí BR pufru. Pufry byly připraveny v rozmezí hodnot pH 2,0 až 13,0. Koncentrace 4-NP v měřených roztocích byla vždy  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. V celém měřeném rozsahu pH látka poskytovala jeden voltametrický pík. Jako optimální prostředí, ve kterém 4-NP poskytoval nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelný DCV či DPV pík, bylo zvoleno pro katodickou oblast potenciálů prostředí BR pufru o pH 6,0 (pro techniku DCV) a 7,0 (pro techniku DPV).

Dále byla sledována opakovatelnost katodického stanovení 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na ls-CFE pro dvacet po sobě následujících měření v optimálním prostředí. Získané relativní směrodatné odchylky ( $s_r$ ) činily 2,2 % (DCV) a 0,4 % (DPV).

V optimálním pH byly proměřeny kalibrační závislosti 4-NP v koncentračním rozmezí 1 až 100  $\mu$ mol/l. Využitelnost nově vyvinutých metodik voltametrického stanovení 4-NP na ls-CFE byla testována na modelových vzorcích pitné vody. Měřené roztoky byly připraveny z 9,0 ml pitné vody s přidavkem příslušného množství zásobního roztoku 4-NP a 1,0 ml BR pufru o optimálním pH. Při měření v katodické oblasti potenciálů bylo možné stanovit 4-NP v modelových vzorcích ve stejném koncentračním rozmezí jako v ideální matici – deionizované vodě, tedy přibližně od 1 do 100  $\mu$ mol/l. Rovněž dosažené  $L_Q$  se liší jen nepatrně. Ze získaných hodnot směrnic je však patrné, že citlivost stanovení je v pitné vodě nižší, což je možné vysvětlit maticovým efektem. Ten se pak více projevuje u techniky DCV,

zatímco u techniky DPV není tak patrný. To by nasvědčovalo přítomnosti povrchově aktivních látek v pitné vodě, které mohou ovlivňovat adsorpci analytu na povrch ls-CFE; adsorpci bývá více ovlivněna právě technika DCV.

## 1.2 Cíle práce

S rostoucím znečištěním přírody kolem nás je třeba vyvíjet nové, citlivé metody stanovení toxických látek.

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem elektrochemického chování vybrané modelové sloučeniny 4-NP na nově připravené ls-CFE s použitím technik DCV a DPV v katodické i anodické oblasti potenciálového okna. 4-NP byl vybrán jako zástupce genotoxických aromatických nitrosloučenin rozpustných ve vodě. Velký specifický povrch pracovní elektrody byl zvolen za účelem eliminace dříve pozorovaného problému s reprodukovatelností nanášení uhlíkového filmu na elektrody s malým průřezem (řádově desetiny  $\text{mm}^2$ ).

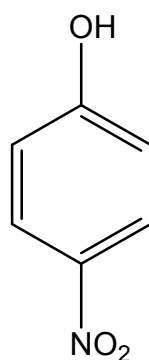
Cíle diplomové práce byly stanoveny následovně:

1. Vyvinout časově a finančně nenáročné elektroanalytické metody pro stanovení 4-NP, které by sloužily jako alternativní metody k běžně používaným optickým či separačním analytickým metodám, a praktickou použitelnost těchto metod ověřit na modelových vzorcích pitné a říční vody.
2. K dosažení nižších hodnot meze stanovitelnosti  $L_Q$  při stanovení 4-NP použít předřazenou prekoncentraci analytu pomocí extrakce tuhou fází (SPE) a vypracovat odpovídající optimalizovanou a prakticky aplikovatelnou metodiku.
3. Pomocí cyklické voltametrie (CV) v roztocích standardních redoxních indikátorů (chloridu hexaamminruthenitého a hexakynoželezitanu draselného) ověřit, zda je děj probíhající na povrchu ls-CFE kontrolován difuzí, a na základě výsledků získaných na ls-CFE a na podkladové platinové elektrodě vypočítat elektroaktivní plochu ls-CFE.
4. Zkoumat mechanismus redoxních přeměn 4-NP pomocí CV na ls-CFE.

## 1.3 Studovaná látka – 4-nitrofenol

### 1.3.1 Vlastnosti 4-nitrofenolu

4-Nitrofenol (4-NP, obr. 1.1; CAS Number 100-02-7,  $M = 139,11$  g/mol) je bezbarvá až světle žlutá pevná látka se slabým zápachem po fenolu [1]. Rozpustnost ve vodě je 12,4 g/l při 20 °C, bod tání je 113-114 °C a bod varu (rozkladu) je 279 °C [2]. Je hořlavý i bez přístupu vzduchu a zvyšuje hořlavost všech ostatních hořlavých látek. Při pokojové teplotě se nevypařuje. 4-NP je uměle člověkem produkováná látka, která se v přírodě přirozeně nevyskytuje. Hlavním zdrojem 4-NP jsou průmyslové výroby, při nichž je 4-NP primárním produktem nebo prekurzorem (např. při výrobě léků, fungicidů či barviv), a také zpracovatelské závody (např. kožedělné) [3]. 4-NP je klasifikován jako nebezpečný, je zdraví škodlivý při vdechování, styku s kůží a při požití. Má kumulativní účinky. Nejčastěji je detekován v následujících průmyslových odvětvích: výroba plastů, elektronických součástek a při povrchových úpravách kovů [4]. Tato látka je často používána v elektrochemii organických sloučenin jako modelová, především díky svému jasně definovanému elektrochemickému chování, a její výzkum pak následně slouží jako podklad pro sledování a popis systémů strukturně složitějších (např. makromolekulárních či supramolekulárních). 4-NP byl použit jako modelová látka i v autorčině předchozí bakalářské práci, ve které jsou jeho vlastnosti podrobněji popsány [5].



**Obr. 1.1**

Strukturní vzorec 4-nitrofenolu

### 1.3.2 Elektrochemické metody stanovení 4-nitrofenolu

4-NP vystupuje v mnoha analytických studiích jako strukturně jednoduchá modelová látka, jejíž výzkum následně slouží jako podklad pro sledování a popis systémů strukturně složitějších, a proto byl již v minulosti stanovován různými analytickými metodami, jako jsou spektrofotometrie [6], fluorimetrie [7], plynová chromatografie (GC) [8], kapilární elektroforéza [9] a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [10]. Ačkoliv jsou tyto techniky běžně používané, jsou poměrně drahé a ne bez nevýhod, protože často zahrnují dlouhou přípravu vzorku a dobu analýzy [11].

V rámci elektrochemie byl 4-NP stanovován řadou metod. Pokrok v použitých metodách je jasně viditelný. Rtuťové elektrody byly nahrazeny moderními alternativami, jako jsou amalgámové elektrody nebo jejich modifikace a kovové elektrody (např. bismutová, zlatá, platinová). Nicméně v případě 4-NP je visící rtuťová kapková elektroda (HDME) v kombinaci s adsorpční rozpouštěcí voltametrií (AdSV) stále nejcitlivější voltametrický senzor [12, 13]. V současné době jsou velmi populární elektrody na bázi síťotisků nebo uhlíkových past (podle posledních publikovaných souhrnných článků [14-16]). Jsou to citlivé senzory použitelné v anodické voltametrii a ampérometrii.

Tématika elektrochemického stanovování 4-NP byla podrobně zpracována v práci [12] a také v autorčině předchozí bakalářské práci [5]. Obě tyto práce jsou z roku 2011, a proto, pro doplnění tématu, jsou v tab. 1.1 shrnuty nejnovější články pojednávající o elektrochemickém stanovení 4-NP.

**Tab. 1.1**

Souhrn elektrochemických metod stanovení 4-NP z literatury za roky 2011 a 2012

Elektroda/modifikátor	Metoda	Lineární rozsah	$L_D$ , mol/l	Citace
GO/GCE <sup>a</sup>	CV	$1 \cdot 10^{-7}$ až $1,2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-8}$	[17]
Cu <sub>2</sub> O/GCE <sup>b</sup>	CV	$1 \cdot 10^{-6}$ až $4 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-7}$	[18]
NPG/GCE <sup>c</sup>	CV	$2,9 \cdot 10^{-7}$ až $7,2 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-7}$	[19]
CHIT/ABPE <sup>d</sup>	CV	$8 \cdot 10^{-8}$ až $2 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-8}$	[20]
DME <sup>e</sup>	DPP	$5 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$	— <sup>f</sup>	[21]
Ag/CPE <sup>g</sup>	DPV	$1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-7}$	[11]
MWCNT/GCE <sup>h</sup>	AM	$8,9 \cdot 10^{-6}$ až $1,4 \cdot 10^{-3}$	$8,9 \cdot 10^{-6}$	[22]
G-Au-CE <sup>i</sup>	AM	$4,7 \cdot 10^{-4}$ až $1,08 \cdot 10^{-2}$	$4,7 \cdot 10^{-7}$	[23]

CV – cyklická voltametrie, DPP – diferenční pulzní polarografie, DPV – diferenční pulzní voltametrie, AM – ampérometrie, GCE – elektroda ze skelného uhlíku

<sup>a</sup> GCE potažená filmem z grafen-oxidu

<sup>b</sup> GCE modifikovaná Cu<sub>2</sub>O nanočásticemi

<sup>c</sup> GCE modifikovaná nanoporézním zlatem

<sup>d</sup> pastová elektroda z acetylenových sazí potažená modifikovaným chitosanem

<sup>e</sup> rtuťová kapající elektroda

<sup>f</sup> hodnota nebyla v práci udána

<sup>g</sup> uhlíková pastová elektroda modifikovaná stříbrnými nanočásticemi

<sup>h</sup> GCE modifikovaná vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami

<sup>i</sup> kompozitní elektroda na bázi grafenu a zlata

## 1.4 Použité voltametrické techniky

Elektrochemické metody jsou užívány pro monitorování škodlivých biologicky aktivních látek v životním prostředí. Tyto metody jsou velmi citlivé, levné a představují nezávislou alternativu k zavedeným spektrometrickým a separačním metodám [24]. Dalšími výhodami jsou přijatelná selektivita, snadná miniaturizovatelnost a automatizovatelnost a v neposlední řadě snadná přenosnost lehkých analytických přístrojů umožňující jejich použití v terénu při velkoplošném monitorování různých škodlivých organických látek [25].

DC voltametrie je technika, při které je na pracovní elektrodu vkládán potenciál lineárně měněný s časem. Závislost měřeného proudu procházejícího

pracovní elektrodou na potenciálu je nazývána proudová odezva a na polarizační křivce se projeví jako voltametrická vlna či voltametrický pík. Výška vlny/píku je přímo úměrná koncentraci stanovované látky a poloha odpovídá typu látky [26].

DP voltametrie je technika, kdy je na pracovní elektrodu vkládán potenciál, který je měněn lineárně s časem, s průběžně periodicky vkládanými potenciálovými pulzy o amplitudě 10-100 mV a době trvání desítek ms. Je registrován rozdíl proudů změřených těsně před vložením potenciálového pulzu a na jeho konci. Závislost měřeného proudu procházejícího pracovní elektrodou na potenciálu se na polarizační křivce projeví jako voltametrický pík. Výška píku je přímo úměrná koncentraci stanovované látky a poloha píku odpovídá kvalitě látky [26].

Cyklická voltametrie je technika, při které prochází zkoumanou soustavou elektrický proud. Na elektrody v roztoku je vkládán potenciál, který je nejprve lineárně zvyšován od počátečního ke zlomovému potenciálu, což je nazýváno dopředným skenem, a poté je snižován ke konečnému potenciálu, což je zpětný sken. Počáteční a konečný potenciál je stejný, dopředný a zpětný sken tvoří cyklus. Pokud je technika omezena jen na polovinu cyklu, jedná se o klasickou DC voltametrii, někdy též nazývanou jako voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu (LSV, z anglického termínu *linear sweep voltammetry*). Rychlost, s jakou je potenciál měněn, určuje časové okno. Elektrolýza probíhá pouze v malé vrstvě v okolí elektrody, a proto je možné získat z jednoho roztoku velký počet voltamogramů (závislost proudu protékající soustavou na vloženém napětí). Důležitou vlastností CV je možnost pomocí zpětného skenu reoxidovat nebo znovu zredukovat produkt vzniklý při dopředném skenu. Ze separace píků, jejich tvarů, poměrů jejich výšek a změn těchto parametrů s rychlostí skenu lze získat informace o kinetice přenosu náboje, mechanismech reakcí či vznikajících produktech a meziproduktech [26].

## 1.5 Kompozitní elektrody

Ve druhé polovině 20. století začala být elektrochemie jednou z nejčastěji používaných metod analýzy životního prostředí, stejně jako chemické analýzy obecně, díky své schopnosti získávat spolehlivé a detailní kvalitativní i kvantitativní informace o složení obrovského množství různých sloučenin. Voltametrie (popř. polarografie) patří do skupiny tradičních elektroanalytických metod, které již jsou úspěšně používány po dobu téměř devadesáti let. Voltametrické metody mohou být považovány za zvláště vhodné pro sledování velkého rozsahu elektrochemicky aktivních látek [27]. Přesto se v posledních dvou desetiletích výrazně snížil počet realizovaných polarografických a voltametrických analýz založených na podobných principech. Jedním z důvodů tohoto poklesu je snaha o omezení používání tradičního materiálu elektrody, tj. kapalně rtuť [28], která v současné době vyvolává neoprávněnou obavu toxicity.

V současnosti dochází k velkému rozvoji nových elektrodových materiálů, které by splňovaly následující požadavky: široké potenciálové okno, mechanickou odolnost umožňující jejich použití v průtokových systémech, nulovou toxicitu a odolnost vůči pasivaci. Pasivace je pravděpodobně největší překážkou pro časté užívání elektroanalytických metod v oblasti analýz životního prostředí.

Pevné elektrody mají další významné výhody: snadná miniaturizovatelnost, možnost tvorby jednorázových senzorů, jednoduchá a levná příprava. Jedno z možných řešení spočívá v užití pevných materiálů elektrod, které neobsahují kapalnou rtuť, jako zlato, stříbro, měď či amalgámy. Tyto elektrody jsou často používány dodnes, jsou složeny ze dvou, nebo více látek a všechny komponenty jsou vodivé materiály (kovy). Další slibná pevná látka, která byla zavedena pro konstrukci elektrod asi před deseti lety, je diamant, přesněji dopovaný diamant – a to většinou dopovaný borem [29, 30].

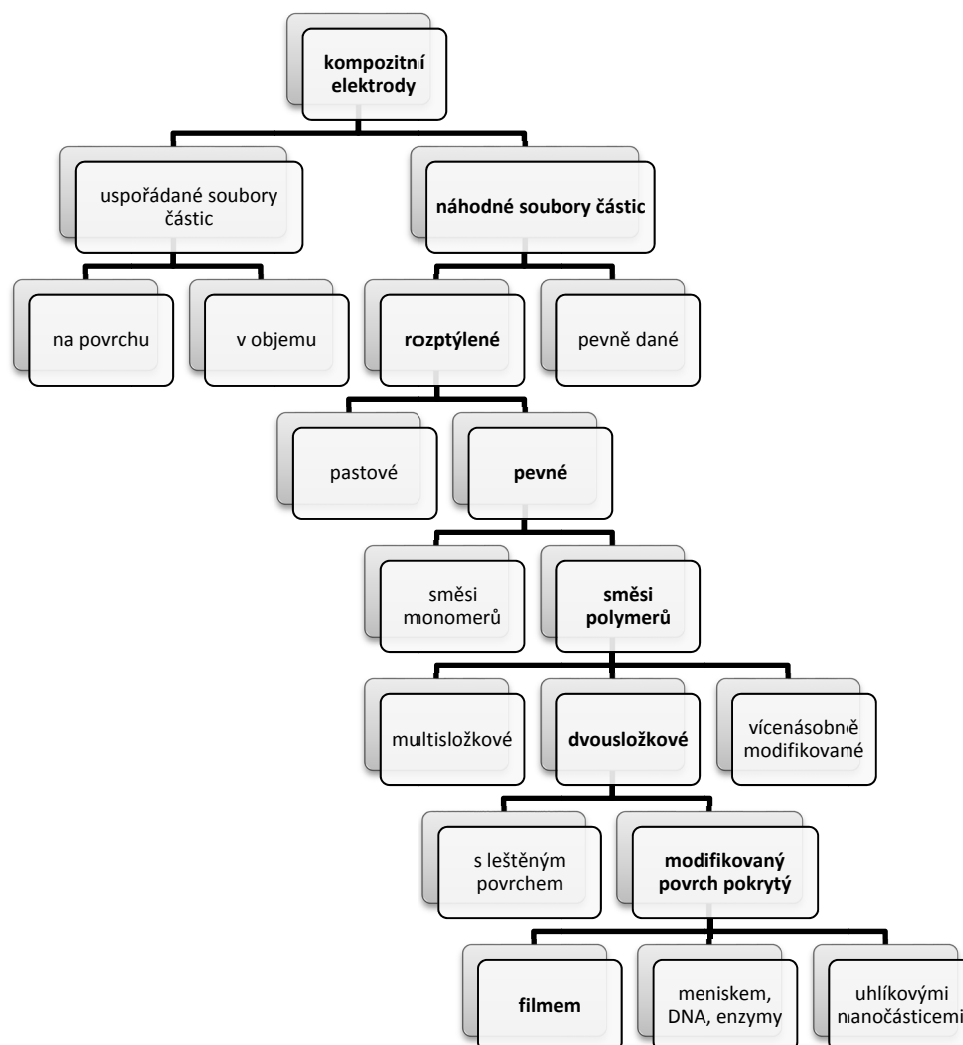
V současné době je obrovské množství prací zabývajících se tématikou kompozitních elektrod a jejich počet stále narůstá. Jedná se o pevné, kapalně nebo pastové kompozitní elektrody. Dále bude pozornost věnována jen pevným kompozitním elektrodám (CSE) a jejich významu především v organické elektrochemii.



### 1.5.1 Klasifikace pevných kompozitních elektrod.

Podle definice, která byla formulována asi před dvaceti lety, se CSE skládá z alespoň jedné vodivé a jedné izolační fáze [30, 31]. Tyto elektrody (zejména ty s náhodně rozptýlenými minimálně dvěma komponentami) jsou, s výjimkou jejich pevné konzistence, částečně analogické elektrody k uhlíkovým pastám. Téma uhlíkových pastových elektrod a jejich význam v organické elektrochemii je podrobně rozebrán v následujících souhrnných článcích [14, 16, 32], i v mnoha dalších.

Bylo navrženo, zkonstruováno a testováno mnoho různých typů CSE a bylo formulováno několik klasifikačních schémat k charakterizaci kompozitních elektrod podle jejich složení a úpravy. Schéma je znázorněno na obr. 1.2 a je založeno na klasickém schématu publikovaném v práci [31]. Tento systém byl upraven některými autory (např. [33, 34]). Obr. 1.2 nepředstavuje nejkomplexnější schéma, je uzpůsoben tématu diplomové práce, ale obsahuje i některé nové trendy ve vývoji.



**Obr. 1.2**

Klasifikační schéma pro kompozitní elektrody. Tučně je zvýrazněna cesta k uhlíkovým filmovým elektrodám

### 1.5.2 Elektrody na bázi uhlíku

Hlavním faktorem ovlivňujícím analytické parametry voltametrického stanovení je druh materiálu, ze kterého je pracovní elektroda vyrobena. Uhlíkové elektrody jsou ceněny pro svou nízkou cenu, nízké proudové pozadí, široké potenciálové okno a nízký šum. Kompozitní pevné elektrody na bázi uhlíku se s úspěchem používají v oblasti anodické oxidace i katodické redukce. Skládají se z nejméně jedné nevodivé komponenty (např. Teflon, polyethylen, polystyren, parafin) a jedné vodivé komponenty: uhlíku v různých strukturách (např. grafitový

prášek, skelný uhlík, uhlíková vlákna, saze, grafit, pyrolytický uhlík, uhlíkové nanočástice atd.) [35].

Povrch CSE je nejčastěji použit v leštěné formě, ale také může být upraven rtuťovým filmem, silikagelem, uhlíkovými nanotrubičkami [33, 36] či biopolymerem DNA [37]. Uhlíkový film na povrchu běžně užívaných elektrod nabízí několik výhod. Nový film se použije pro každé měření a jeho likvidace je zjednodušena a urychlena pouze na odstranění filmu otřením o filtrační papír.

### 1.5.3 Velkoplošná uhlíková filmová elektroda

Pracovní elektroda je nedůležitější součást voltametrické analýzy. Na rozdíl od klasické kapající rtuťové elektrody, která poskytuje úzké potenciálové okno v anodické oblasti limitované rozpouštěním rtuti při asi +400 mV, je potenciálové okno mnoha uhlíkových materiálů poněkud širší. Největším problémem všech pevných elektrod je pasivace na jejich povrchu, a proto je věnována velká pozornost jejich předpřípravě, která zlepšuje opakovatelnost získaných voltametrických výsledků. Problém pasivace můžeme částečně obejít užíváním jednorázových elektrod, například sítotiskových elektrod založených na skelném uhlíku nebo uhlíkovém prášku [38]. Opakovatelnost stanovení a dostupný rozsah pracovních potenciálů různých pevných elektrod může být zlepšen pokrytím jejich povrchu vodivým filmem, např. uhlíkovým [39].

Princip uhlíkové filmové elektrody spočívá v nanesení filmu na povrch pevné elektrody. Film je složen z vodivých mikročástic a nevodivého polymeru. Taková elektroda má vlastnosti podobné materiálu, ze kterého jsou vytvořeny mikročástice, a díky tomu je schopna vratně měnit potenciálové okno původní elektrody. Vodivé mikročástice poskytují elektrický kontakt mezi analyzovaným roztokem a vodivou částí elektrody. Polymer je nevodič, který izoluje analyzovaný roztok od vodivé části elektrody. Za tohoto předpokladu je pevná elektroda jen vodič, zatímco mikročástice vodivého materiálu rozptýlené v polymeru formují hotový elektrodový materiál a chrání kontakt mezi analyzovanou látkou a vodivou částí elektrody.

Uhlík, respektive jeho modifikace grafit, je materiál, jenž poskytuje široké potenciálové okno, které je použitelné pro anodické oxidace i katodické redukce. V závislosti na poměru polymeru a vodivého uhlíkového prášku se uhlíková filmová elektroda chová buď jako mikroelektrodové pole, nebo jako klasická elektroda s homogenním povrchem [24]. Problém pasivace na povrchu filmu může být řešen setřením původního a nanesením nového filmu, jehož obnova je rychlá a jednoduchá. Pokud je použita vhodná elektrochemická předúprava, může být stejný film používán i opakovaně [40]. Vzhledem k dříve pozorované nižší reprodukovatelnosti nanášení uhlíkového filmu na kovovou pracovní elektrodu s malým průřezem [41] byla v této diplomové práci použita podkladová elektroda velkoplošná (s přibližně padesátkrát větším povrchem), u které se potvrdilo zlepšení reprodukovatelnosti nanášení filmů v autorčině předchozí bakalářské práci [5].

Uhlíkových filmových elektrod je mnoho druhů. V 80. letech 20. století byla věnována velká pozornost uhlíkovým filmovým elektrodám z pyrolytického grafitu. Publikované práce se zabývaly jejich vlastnostmi, charakterizací, porovnáním s ostatními elektrodami, například s elektrodou ze skelného uhlíku [42], a jejich použitelností při různých elektrochemických technikách [42-49]. Před několika lety bylo na tuto tematiku navázáno a byly provedeny další porovnávací studie [50, 51]. V posledních dvou letech se objevila série článků o filmu z nanokrystalického grafitu, na kterém bylo prováděno jak současné stanovení kyseliny askorbové, dopaminu a kyseliny močové, tak další voltametrická stanovení, např. hydrazinu, thiolů či olova [52-56].

Dalšími modifikacemi uhlíkových filmových elektrod je například platinizovaný diamantem modifikovaný uhlíkový film [57], supertenký uhlíkový film či uhlíkové filmy modifikované grafitovým práškem a uhlíkovými nanotrubičkami [58]. Charakterizace vodivého uhlíkového filmu byla provedena již v roce 1984 [59].

Uhlíkové filmy v různých modifikacích jsou používány ve většině odvětví analytické chemie: v ampérometrii [60, 61], kapalinové chromatografii [62], NMR spektroskopii [60] i v optických metodách [63]. Elektrody na bázi mikromletého grafitu CR 2, který je předmětem této práce, byly využity v pracích [64-67].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Reagencie

Studovaná látka: 4-nitrofenol (4-NP; 98 %, Sigma-Aldrich, SRN). Zásobní roztok 4-NP (100 ml o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) byl připraven rozpuštěním 0,01391 g této látky v deionizované vodě (Millipore, USA). Roztok o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l byl připraven z tohoto zásobního roztoku přesným zředěním. Zásobní roztok byl uchováván ve tmě za laboratorní teploty.

Brittonovy-Robinsonovy pufrы (BR pufrы) byly připraveny z následujících chemikálií: kyselina trihydrogenboritá (čistota p.a., Lachema, Brno), octová kyselina (80 %, čistota p.a., Lach-Ner, Neratovice), kyselina trihydrogen-fosforečná (85 %, čistota p.a., Lach-Ner, Neratovice), hydroxid sodný (čistota p.a., Lach-Ner, Neratovice). Byly připraveny dvě složky BR pufru. Kyselé složka BR pufru byla připravena smícháním 2,71 ml kyseliny trihydrogenfosforečné, 2,81 ml octové kyseliny a 2,47 g kyseliny trihydrogenborité a doplněním deionizovanou vodou na celkový objem 1,0 l. Výsledná hodnota pH kyselé složky byla 2,0. Zásaditá složka BR pufru o celkovém objemu 1,0 l byla připravena rozpuštěním 8,0 g hydroxidu sodného v deionizované vodě (výsledné pH 13,0).

Zásobní roztok chelatonu 3 (100 ml o  $c = 0,1$  mol/l) byl připraven rozpuštěním 3,7226 g této látky ( $C_{10}H_{14}O_8N_2Na_2 \cdot 2H_2O$ , čistota p.a., Lachema, Brno) v deionizované vodě.

Pro elektrochemickou charakterizaci pracovní elektrody pomocí CV byl použit chlorid hexaamminruthenitý ( $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ ; 98%, Sigma-Aldrich, SRN). Zásobní roztok (100 ml o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) vznikl rozpuštěním 0,03091 g této látky v roztoku chloridu draselného (KCl; 100 ml o koncentraci 0,1 mol/l; čistota p.a., Lachema, Brno) připraveném rozpuštěním 0,7456 g KCl v deionizované vodě. Za stejným účelem byl také použit roztok hexakynoželezitanu draselného ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ; čistota p.a., Lachema, Brno) o stejné koncentraci, vznikl rozpuštěním 0,03293 g této látky v roztoku chloridu draselného (příprava viz výše).

Ostatní použité chemikálie: obalový pěnový polystyren, mikromletý přírodní grafit CR 2 (99,5 %, zrnitost 3,5-5,5  $\mu m$ , Graphite Týn, Týn nad Vltavou), 1,2-dichlorethan (Sigma-Aldrich, SRN), diethylether (nastabilizovaný), aceton, methanol a ethylester octové kyseliny (vše čistota p.a., Lach-Ner, Neratovice).

## 2.2 Aparatura

Spektrofotometrická měření byla prováděna na spektrofotometru Agilent 8453, ovládaném programem UV-Visible ChemStation (obojí Agilent Technologies, USA), v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1,0 cm.

Pro voltametrická měření byla použita osobním počítačem řízená sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem Polar Pro 5.1 (vše Polaro-Sensors, Praha), který pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, USA). Všechna měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Jako referentní elektroda byla použita argentchloridová elektroda ETP-CZ-R00209 (3 mol/l KCl, Monokrystaly, Turnov). Jako pomocná byla použita platinová drátková elektroda (Monokrystaly, Turnov). Pracovní elektrodou byla pevná platinová elektroda [68] (typ 6.1204.120, Metrohm, Švýcarsko) pokrytá vrstvou uhlíkového filmu (Is-CFE; viz kapitola 2.3).

Pro měření DPV na Is-CFE byly na elektrodu vkládány pulzy o modulační amplitudě -50 mV a šířce 100 ms. Rychlost nárůstu potenciálu byla 20 mV/s pro obě techniky (DCV i DPV na Is-CFE). Pro měření CV na Is-CFE a platinové elektrodě byla měněna rychlost polarizace v rozsahu 10 mV/s až 500 mV/s (viz kapitola 5.3).

Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005).

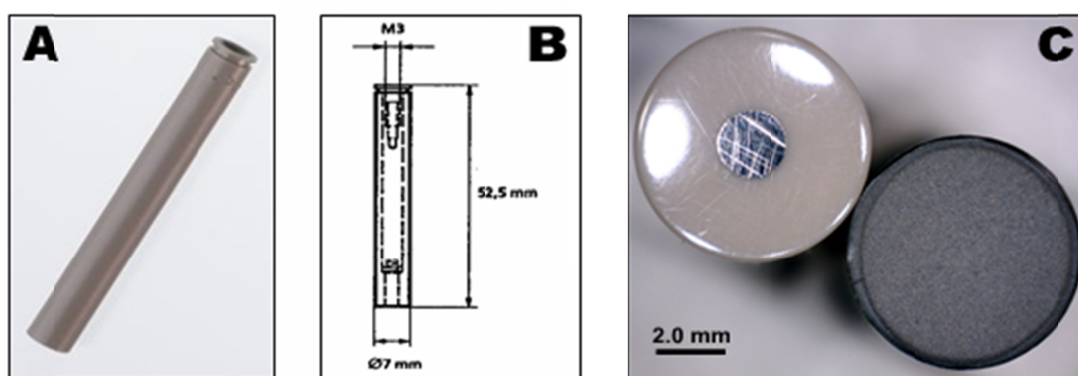
Pro extrakci tuhou fází (SPE) byly použity kolonky LiChrolut EN (200 mg sorbentu, objem 3 ml) a LiChrolut RP-18E (zrnitost 40-63  $\mu\text{m}$ , 200 mg sorbentu, objem 3 ml) (obojí Merck, SRN). Kolonka byla napojena na extraktor, ten byl přes pojistnou nádobu spojen s pumpou zajišťující podtlak. Připravené vzorky 4-FN v říční vodě byly před SPE přefiltrovány přes filtry MNGF-3 (průměr 50 mm, Macherey-Nagel, SRN).

Fotografie z elektronového mikroskopu byly pořízeny na skenovacím elektronovém mikroskopu JSM-6380LV (JEOL, Tokio, Japonsko).

## 2.3 Použitá pracovní elektroda

Ke studiu chování 4-NP ve vodných roztocích byla použita ls-CFE tvořená uhlíkovým filmem pokrývajícím povrch pevné platinové elektrody (obr. 2.1). Rozměr platinového disku elektrody byl  $2,0 \pm 0,1$  mm a celkový průměr aktivní plochy byl 7,0 mm (průřez  $38,5 \text{ mm}^2$ ); tělo zhotoveno z polyetheretherketonu (PEEK).

Uhlíkový inkoust byl připraven smícháním 0,09 g uhlíku CR 2 a 0,01 g polystyrenu s 0,5 ml 1,2-dichlorethanu. Toto složení uhlíkového filmu bylo přejato z prací [5, 41, 69], testováno na možné modifikace [70] a zvoleno za nejvhodnější. Inkoust byl homogenizován mícháním pomocí třepačky Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA) po dobu 2 min. Pomocí automatické pipety (Biohit, Finsko) byla na elektrodu nanášena vrstva inkoustu o objemu 10  $\mu\text{l}$ . Po 2 min, kdy došlo k úplnému vytěkání rozpouštědla, se na povrchu elektrody vytvořil film a elektrodu bylo možné použít. Pro měření v anodické oblasti nebyla nalezena ideální elektrochemická předúprava a každé měření bylo prováděno na nově připraveném elektrodovém povrchu. Obnova filmu byla realizována otřením starého filmu o filtrační papír a nanesení nového filmu. V předchozí studii [41], kde byla použita uhlíková filmová elektroda s přibližným průřezem podkladové elektrody  $0,8 \text{ mm}^2$  a anodická DPV odezva 4-nitro-3-trifluormethylanilinu jako standardu, se nejlepší dosažené opakovatelnosti tvorby nového filmu pohybovaly v hodnotách 10-12 %. Použitím podkladové elektrody o průřezu přibližně padesátkrát větším bylo dosaženo opakovatelnosti kvality uhlíkového filmu s hodnotou nižší než 1 % [70].



**Obr. 2.1**

Podkladová platinová pevná elektroda (fotografie elektrody poskytovaná výrobcem [68] (A) a technický náčrtek elektrody (B)) a fotografie podkladové elektrody před a po nanesení uhlíkového filmu (C)

## 2.4 Pracovní postupy

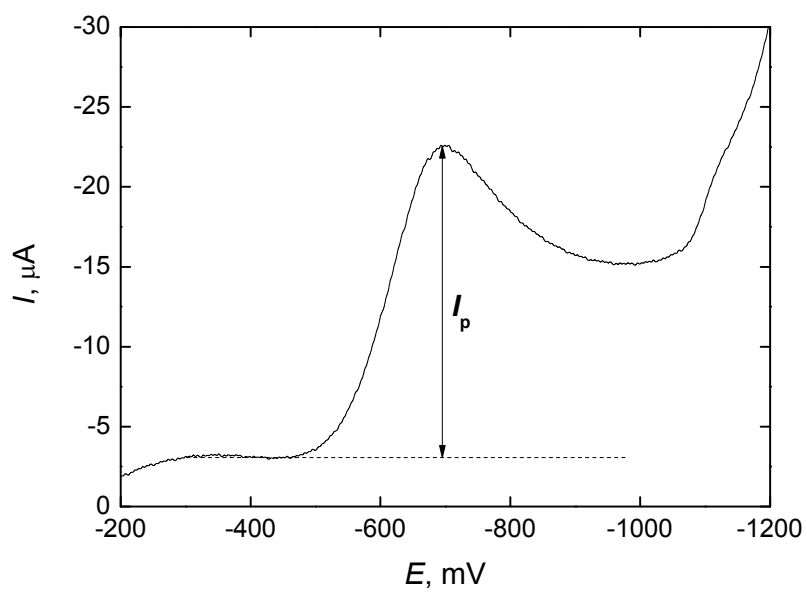
Všechny roztoky pro měření pH závislosti a opakovatelnosti stanovení 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) byly připravovány v 10,0-ml odměrné baňce. Pomocí automatické pipety (Biohit, Finsko) byl odpipetován 1,0 ml zásobního roztoku 4-NP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l a baňka byla doplněna po rysku BR pufrům o požadovaném pH. Roztoky pro měření koncentračních závislostí byly připravovány obdobným způsobem: v 10,0-ml odměrných baňkách (doplněných BR pufrům o optimální hodnotě pH), ve kterých byla postupně zvyšována koncentrace 4-NP. Modelové vzorky pitné vody byly připraveny přidáním odpovídajícího množství zásobního roztoku 4-NP do pitné vody (vodovodní řád v budově Chemického ústavu, PřF UK Praha). 9,0 ml pitné vody s přídavkem 4-NP bylo doplněno do 10,0 ml BR pufrům o optimální hodnotě pH (faktor zředění 0,9). Stejný postup byl uplatněn při přípravě modelových vzorků říční vody (říční voda byla odebrána z Vltavy - lokalita Výtoň, Praha).

Připravené vzorky byly převedeny do voltametrické nádoby a následně (pouze v případě měření v katodické oblasti potenciálů) zbaveny kyslíku probuláním dusíkem (čistota 4.0, Linde, Praha, ČR) po dobu 2 min. Poté byl proveden záznam voltamogramu. Všechna měření byla provedena za laboratorní teploty a opakována nejméně pětkrát, desetkrát v případě měření opakovatelnosti nanášení filmů. V katodické oblasti potenciálů byl roztok mezi jednotlivými měřeními probublán po dobu 20 s. Vyhodnocení výšky voltametrických piků je znázorněno na obr. 2.2 a 2.3. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty.

K provádění potřebných výpočtů a tvorbě grafů uvedených v této práci bylo použito programů Origin Pro 8.0 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). Konfidenční pásy (na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ) u kalibračních přímek byly vyhodnoceny a sestrojeny pomocí programu Origin Pro 8.0.

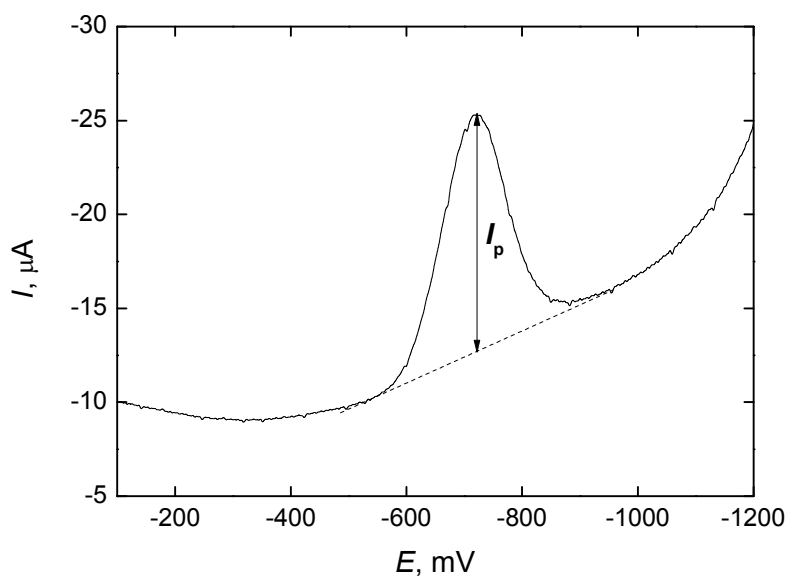
U kalibračních přímek byly sestrojeny konfidenční pásy na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  [71]. Mez stanovitelnosti ( $L_Q$ ) byla počítána jako koncentrace odpovídající desetinásobku směrodatné odchylky voltametrického stanovení 4-NP (pro počet měření  $n = 10$ ) o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky [72].





**Obr. 2.2**

Grafické znázornění způsobu odečtení výšky píku ( $I_p$ ) pro měření DCV na ls-CFE



**Obr. 2.3**

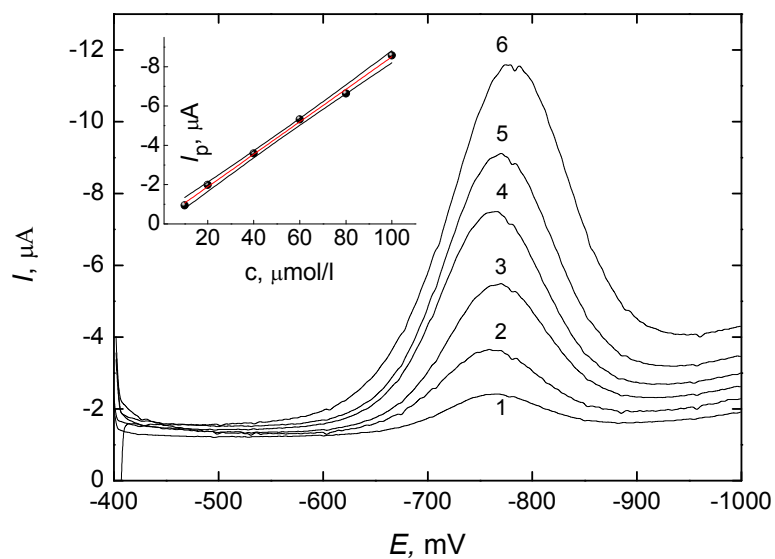
Grafické znázornění způsobu odečtení výšky píku ( $I_p$ ) pro měření DPV na ls-CFE

### 3 VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 4-NITROFENOLU NA LS-CFE

#### 3.1 Kompletace tématu bakalářské práce

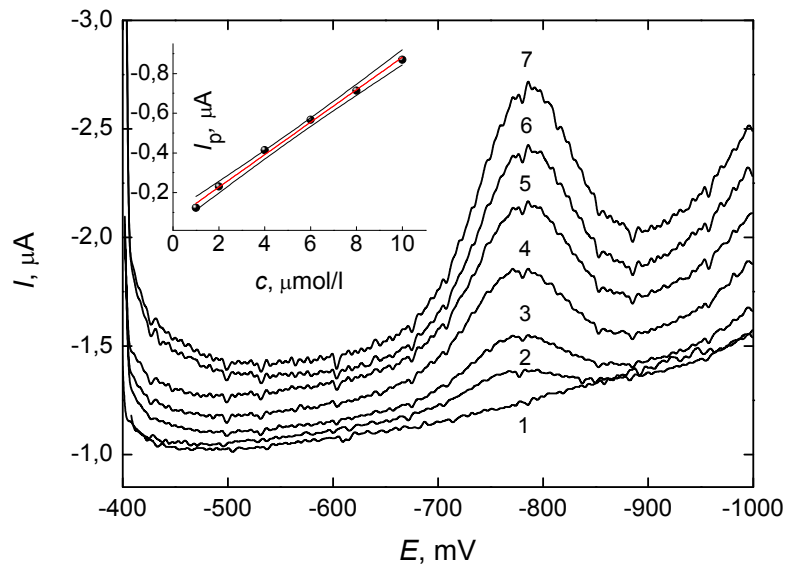
Cílem této práce, jak již bylo zmíněno, bylo prostudovat elektrochemické chování 4-NP na nově připravené ls-CFE s použitím technik DCV a DPV v katodické i anodické oblasti potenciálového okna a praktickou využitelnost této elektrody ověřit na modelových vzorcích pitné a říční vody. V rámci bakalářské práce byla studována katodická oblast potenciálového okna a použitelnost metody v modelových vzorcích pitné vody. V navazující diplomové práci byla proměřena kalibrační závislost v modelových vzorcích říční vody v této oblasti (postup přípravy viz kapitola 2.4).

Kalibrační závislosti 4-NP byly proměřeny technikami DCV (při pH 6,0) a DPV (při pH 7,0) na ls-CFE v koncentračních rozmezích  $(1-10) \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $(1-10) \cdot 10^{-6}$  mol/l (udávaná koncentrace odpovídá koncentraci 4-NP v modelovém vzorku říční vody (říční voda s přidavkem 4-NP – BR pufr o pH 7,0 (9:1))) a oba koncentrační řady byly měřeny na jednom uhlíkovém filmu. Příklady kalibračních závislostí pro příslušná koncentrační rozmezí jsou zobrazeny na obr. 3.1 a 3.2. Souhrnné výsledky měření stanovení 4-NP v katodické oblasti potenciálového okna jsou znázorněny v tab. 3.1.



**Obr. 3.1**

DP voltamogramy 4-NP na ls-CFE v modelových vzorcích říční vody. Koncentrace 4-NP v říční vodě:  $1 \cdot 10^{-5}$  (1) ;  $2 \cdot 10^{-5}$  (2) ;  $4 \cdot 10^{-5}$  (3) ;  $6 \cdot 10^{-5}$  (4) ;  $8 \cdot 10^{-5}$  (5) ;  $10 \cdot 10^{-5}$  (6) mol/l. Příslušná kalibrační závislost je zobrazena ve vloženém grafu; konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  ( $n = 5$ )



**Obr. 3.2**

DP voltamogramy 4-NP na ls-CFE. Koncentrace 4-NP v modelových vzorcích říční vody. Koncentrace 4-NP v říční vodě: 0 (1) ;  $1 \cdot 10^{-6}$  (2) ;  $2 \cdot 10^{-6}$  (3) ;  $4 \cdot 10^{-6}$  (4) ;  $6 \cdot 10^{-6}$  (5) ;  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) ;  $10 \cdot 10^{-6}$  (7) mol/l. Příslušná kalibrační závislost je zobrazena ve vloženém grafu; konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  ( $n = 5$ )

**Tab. 3.1**

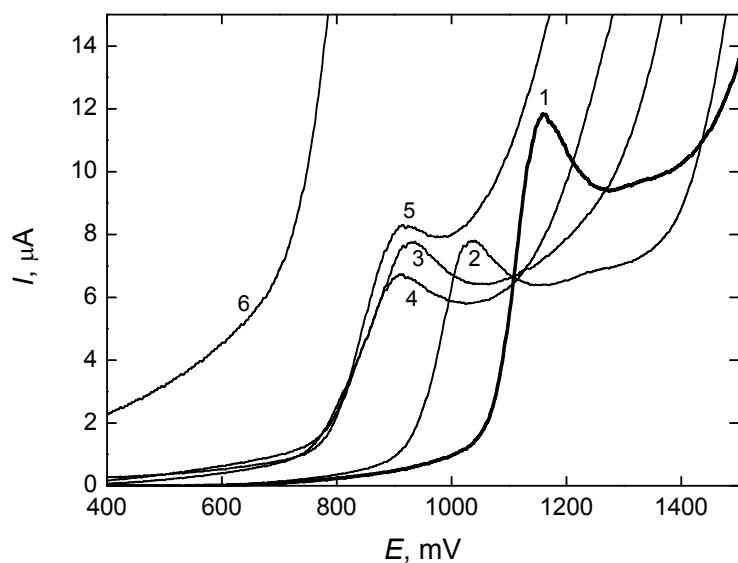
Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NP v prostředí BR pufru (deionizovaná voda jako ideální matrice) a v modelových vzorcích pitné a říční vody (o složení voda – BR pufr (9:1)) pomocí katodické voltametrie na ls-CFE; směrodatné odchylky hodnot směrnic a úseků jsou vypočteny pro  $n = 5$

Technika (matrice; pH BR pufru)	$c$ , mol/l	Směrnice, mA·l/mol	Úsek, μA	$R$	$L_Q$ , mol/l
DCV	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-141,5 \pm 1,2$	$0,74 \pm 0,08$	-1,000	—
(dei. voda; 6,0)	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-123,7 \pm 2,8$	$-0,03 \pm 0,02$	-0,999	$2,3 \cdot 10^{-6}$
DCV	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-127,9 \pm 2,9$	$0,34 \pm 0,17$	-0,999	—
(pitná voda; 6,0)	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-105,7 \pm 3,0$	$-0,10 \pm 0,02$	-0,998	$1,0 \cdot 10^{-6}$
DCV	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-44,2 \pm 0,6$	$-0,03 \pm 0,03$	-0,992	—
(říční voda; 6,0)	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-68,9 \pm 1,2$	$0,20 \pm 0,06$	-0,996	$1,9 \cdot 10^{-6}$
DPV	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-90,0 \pm 1,0$	$-0,10 \pm 0,06$	-0,999	—
(dei. voda; 7,0)	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-107,3 \pm 4,5$	$0,16 \pm 0,03$	-0,997	$1,8 \cdot 10^{-6}$
DPV	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-63,4 \pm 2,5$	$-0,07 \pm 0,15$	-0,996	—
(pitná voda; 7,0)	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-62,9 \pm 2,2$	$-0,03 \pm 0,01$	-0,997	$1,3 \cdot 10^{-6}$
DPV	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-82,7 \pm 1,9$	$-0,24 \pm 0,12$	-0,999	—
(říční voda; 7,0)	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-81,8 \pm 2,3$	$-0,06 \pm 0,01$	-0,998	$1,0 \cdot 10^{-6}$

## 3.2 Stanovení 4-NP v anodické oblasti potenciálového okna

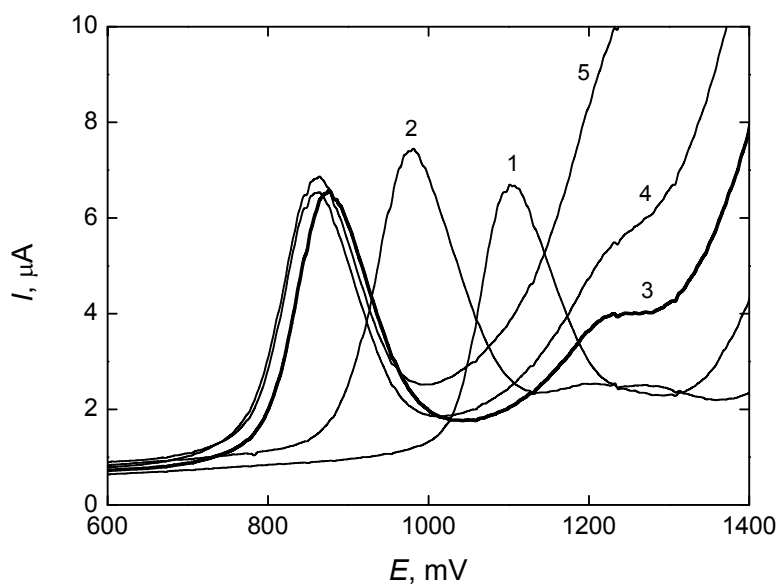
### 3.2.1 Zjištění optimálního pH

Nejprve byl sledován vliv pH na elektrochemické chování 4-NP na ls-CFE technikami DCV i DPV a zjišťováno optimální pH stanovení. Byla proměřována sada roztoků obsahujících BR pufrů v rozmezí hodnot pH 2,0 až 13,0 s přídavkem 4-NP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. V celém měřeném rozsahu pH látka poskytovala jeden voltametrický pík. Pro techniku DCV bylo jako optimální zvoleno prostředí BR pufru o pH 3,0 a pro techniku DPV bylo zvoleno pH 7,0; v těchto prostředích látka poskytovala nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelné píky. Na obr. 3.3 (pro techniku DCV) a obr. 3.4 (pro techniku DPV) jsou znázorněny naměřené křivky závislosti proudu na potenciálu píku v závislosti na pH. Pro přehlednost jsou zobrazeny pouze křivky pro lichá pH z toho důvodu, že optimální pH pro obě techniky je liché. Lze pozorovat, že s rostoucím pH se potenciál píku posouvá k zápornějším hodnotám až do pH pufru 8,0 a dále se nemění. Naměřené hodnoty proudu píku ( $I_p$ ) a potenciálu píku ( $E_p$ ) při měnícím se pH znázorňuje tab. 3.2 (pro DCV) a tab. 3.3 (pro DPV). Graficky jsou znázorněny závislosti hodnoty  $E_p$  na pH na obr. 3.5 a obr. 3.6.



**Obr. 3.3**

DC voltamogramy 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 3,0 (1) ; 5,0 (2) ; 7,0 (3) ; 9,0 (4) ; 11,0 (5) ; 13,0 (6). Voltamogram reprezentující optimální prostředí je označen tlustou čarou



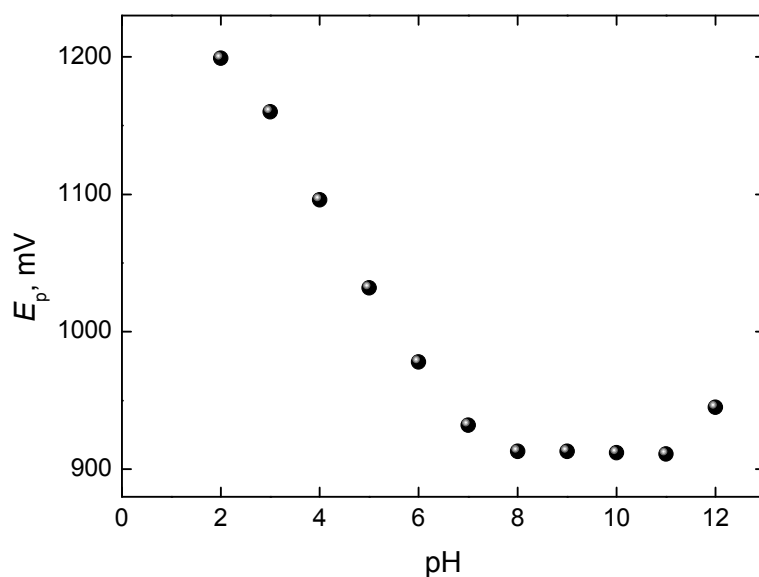
**Obr. 3.4**

DP voltamogramy 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 3,0 (1) ; 5,0 (2) ; 7,0 (3) ; 9,0 (4) ; 11,0 (5) ; 13,0 (6). Voltamogram reprezentující optimální prostředí je označen tlustou čarou

**Tab. 3.2**

Závislost hodnot  $E_p$  a  $I_p$  na pH, měřeno technikou DCV na ls-CFE v roztoku 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) v prostředí BR pufru o příslušném pH

pH	$E_p$ , mV	$I_p$ , nA
2,0	1199	9549
3,0	1160	11210
4,0	1096	9919
5,0	1032	7568
6,0	978	7320
7,0	932	7060
8,0	913	6621
9,0	913	6863
10,0	912	6293
11,0	911	6839
12,0	945	9519
13,0	—	—

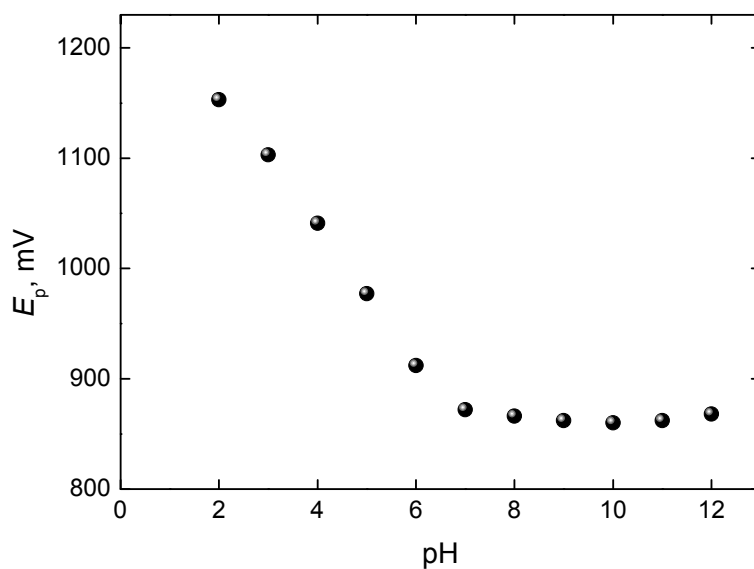
**Obr. 3.5**

Závislost potenciálu  $E_p$  na pH měřené technikou DCV na ls-CFE v roztoku 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) v prostředí BR pufru o příslušném pH

**Tab. 3.3**

Závislost hodnot  $E_p$  a  $I_p$  na pH měřené technikou DPV na ls-CFE v roztoku 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) v prostředí BR pufru o příslušném pH

pH	$E_p$ , mV	$I_p$ , nA
2,0	1153	5218
3,0	1103	4841
4,0	1041	5760
5,0	977	5627
6,0	912	5451
7,0	872	5225
8,0	866	4951
9,0	862	5078
10,0	860	5051
11,0	862	5037
12,0	868	5564
13,0	—	—

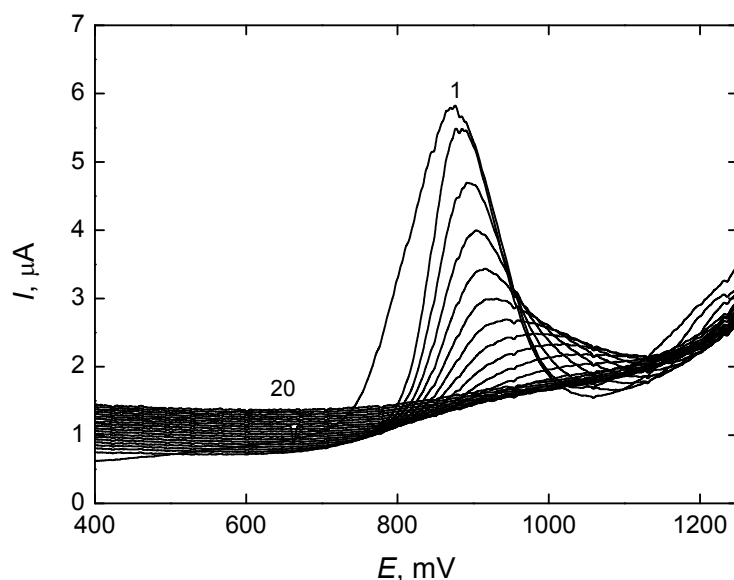
**Obr. 3.6**

Závislost potenciálu  $E_p$  na pH měřené technikou DPV na ls-CFE v roztoku 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) v prostředí BR pufru o příslušném pH



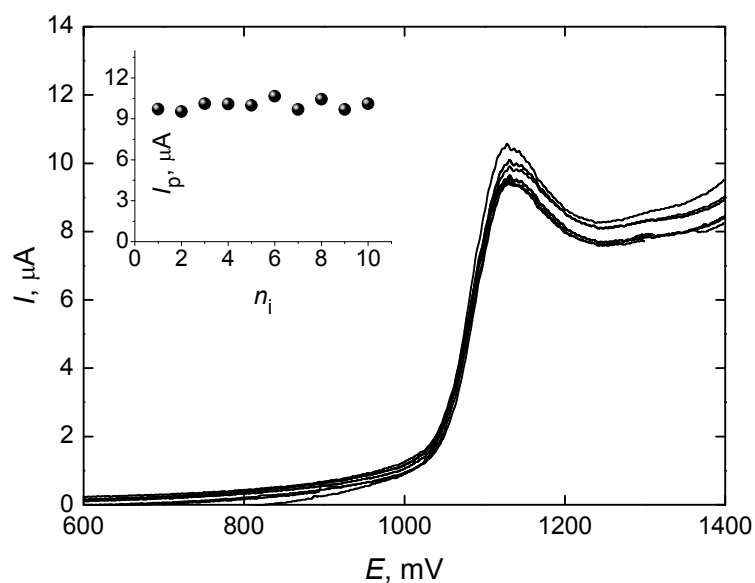
### 3.2.2 Opakovatelnost měření a nanášení uhlíkových filmů

Pro nejvyšší koncentraci 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na ls-CFE byla technikou DPV při pH 7,0 změřena opakovatelnost anodického stanovení dvaceti po sobě jdoucích měření v rozsahu potenciálů 0 až 1200 mV. Na obr. 3.7 jsou znázorněny voltamogramy těchto měření v roztoku 4-NP. Mezi každým měřením byl roztok po dobu 20 s promíchán. Z obrázku je patrné, že první měřená křivka nemá ideální tvar. Tento jev byl pozorován u všech měření DP voltamogramů, a proto byla k vyhodnocování vždy využita druhá měřená křivka. Dle očekávání docházelo k zvýšené pasivaci elektrodového povrchu vznikem polyfenolických filmů jako produktu anodické oxidace 4-NP, a tím i k poklesu výšky píků [73]. Byly testovány různé možnosti vkládání regeneračních potenciálů, ale žádná ze zkoušených variant nebyla vybrána jako optimální. V tomto případě byla úspěšně využita jedna z předností ls-CFE, a to snadná obnovitelnost elektrodového povrchu. Proto byla opakovatelnost stanovení 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) měřena na deseti nově nanesených filmech a získané hodnoty  $s_r$  byly 3,6 % pro techniku DCV (obr. 3.8) a 3,7 % pro techniku DPV (obr. 3.9).



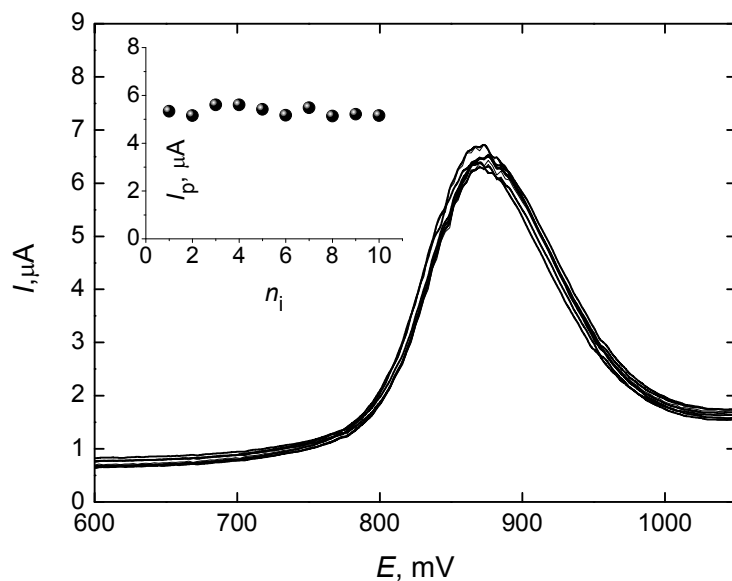
**Obr. 3.7**

DP voltamogramy 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) při měření opakovatelnosti na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 7,0 ( $n = 20$ )



**Obr. 3.8**

DC voltamogramy 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) při měření opakovatelnosti nanášení filmů v BR pufru o pH 3,0 ( $n = 10$ ). Ve vloženém grafu je znázorněna odpovídající závislost  $I_p$  na pořadovém čísle filmu ( $n_i$ )



**Obr. 3.9**

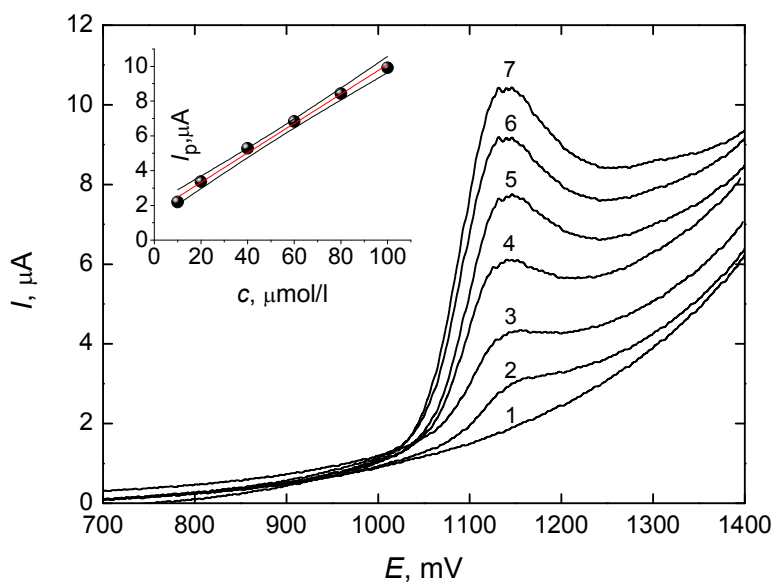
DP voltamogramy 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) při měření opakovatelnosti nanášení filmů v BR pufru o pH 7,0 ( $n = 10$ ). Ve vloženém grafu je znázorněna odpovídající závislost  $I_p$  na pořadovém čísle filmu ( $n_i$ )

### 3.2.3 Koncentrační závislost

Byly proměřeny kalibrační závislosti 4-NP na ls-CFE v prostředí BR pufru o optimálním pH v koncentračních rozmezech  $(1-10) \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $(1-10) \cdot 10^{-6}$  mol/l (každá koncentrace byla měřena na novém uhlíkovém filmu). Nižší měřené koncentrace již nebylo možné vyhodnotit. Příklad DC voltamogramů, (měřené v roztocích o pH 3,0) pro koncentrační řád  $10^{-5}$  mol/l je znázorněn na obr. 3.10. Nižší koncentrační řád není znázorněn z toho důvodu, že minimální naměřená koncentrace byla  $4 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Poté byly proměřeny DP voltamogramy (v roztocích o pH 7,0) pro příslušná rozmezí jsou znázorněny na obr. 3.11 a 3.12. Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NP jsou shrnuty v souhrnné tab. 3.4 (viz kapitola 3.2.5).

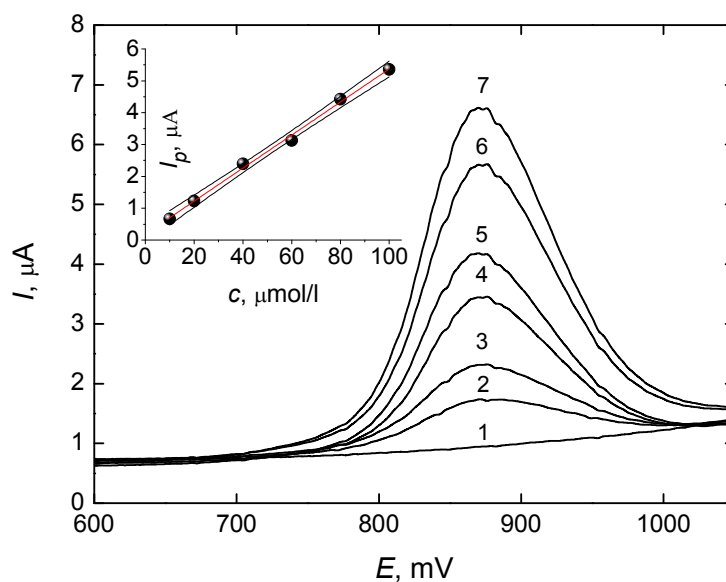
Porovnáním výsledků získaných technikou DCV a technikou DPV na ls-CFE lze dospět k závěru, že technika DPV na ls-CFE poskytuje vyšší citlivost a nižší hodnotu  $L_Q$ , což je v souladu s obecně známým faktem, že pulzní techniky vykazují vyšší citlivost než techniky s lineárním nárůstem potenciálu. Z důvodu lepších dosažených výsledků při stanovení 4-NP na ls-CFE pomocí techniky DPV jsou dále pro ilustraci zobrazovány jen DP voltamogramy.

U obou technik se mírně liší hodnoty nejnižších měřitelných koncentrací analytu s vypočtenými hodnotami mezí stanovitelnosti ( $L_Q$ ). U techniky DCV je to z důvodu metody výpočtu meze stanovitelnosti (jako koncentrace odpovídající desetinásobku směrodatné odchylky voltametrického stanovení 4-NP (pro počet měření  $n = 10$ ) o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky). Pokud by byl prováděn jiný typ výpočtu  $L_Q$  (např. jako koncentrace, při které látka vyvolá odezvu měřicího přístroje větší, než je desetinásobek šumu pozadí) [74] a byl by aplikován například pro stanovení 4-NP v deionizované vodě technikou DCV, výsledná  $L_Q$  by odpovídala hodnotě  $4 \cdot 10^{-6}$  mol/l, což téměř přesně odpovídá skutečně naměřené hodnotě  $6 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Pro techniku DPV by bylo pravděpodobně možné dosáhnout nižších koncentrací, ale koncentrační řád  $10^{-7}$  mol/l nebyl měřen. Dalšího snížení meze stanovitelnosti bylo dosaženo pomocí předřazené prekoncentrace analytu pomocí extrakce tuhou fází (viz kapitola 4).



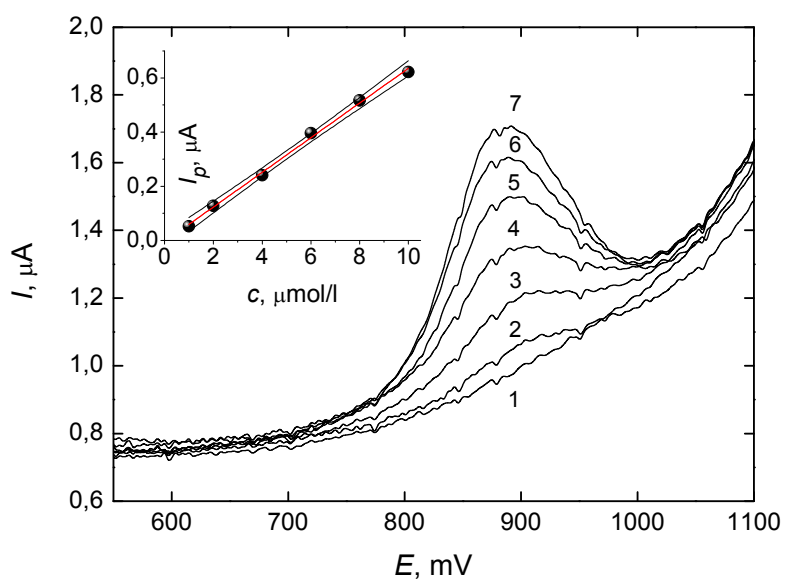
**Obr. 3.10**

DP voltamogramy 4-NP na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 3,0. Koncentrace 4-NP: 0 (1) ;  $1 \cdot 10^{-5}$  (2) ;  $2 \cdot 10^{-5}$  (3) ;  $4 \cdot 10^{-5}$  (4) ;  $6 \cdot 10^{-5}$  (5) ;  $8 \cdot 10^{-5}$  (6) ;  $10 \cdot 10^{-5}$  (7) mol/l. Příslušná kalibrační závislost je zobrazena ve vloženém grafu; konfidenční pásy sestaveny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  ( $n = 5$ )



**Obr. 3.11**

DP voltamogramy 4-NP na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 7,0. Koncentrace 4-NP: 0 (1) ;  $1 \cdot 10^{-5}$  (2) ;  $2 \cdot 10^{-5}$  (3) ;  $4 \cdot 10^{-5}$  (4) ;  $6 \cdot 10^{-5}$  (5) ;  $8 \cdot 10^{-5}$  (6) ;  $10 \cdot 10^{-5}$  (7) mol/l. Příslušná kalibrační závislost je zobrazena ve vloženém grafu; konfidenční pásy sestaveny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  ( $n = 5$ )



**Obr. 3.12**

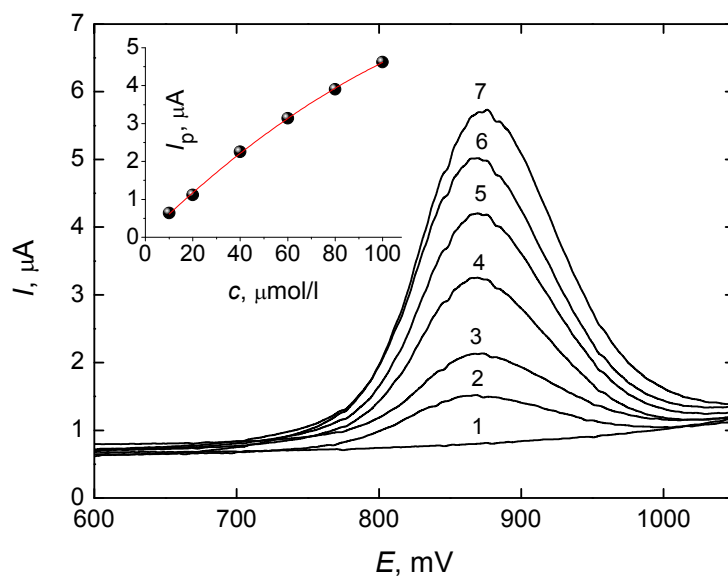
DP voltamogramy 4-NP na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 7,0. Koncentrace 4-NP: 0 (1) ;  $1 \cdot 10^{-6}$  (2) ;  $2 \cdot 10^{-6}$  (3) ;  $4 \cdot 10^{-6}$  (4) ;  $6 \cdot 10^{-6}$  (5) ;  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) ;  $10 \cdot 10^{-6}$  (7) mol/l. Příslušná kalibrační závislost je zobrazena ve vloženém grafu; konfidenční pásy sestaveny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  ( $n = 5$ )

### 3.2.4 Koncentrační závislost v modelových vzorcích pitné vody

V modelových vzorcích pitné vody byla ověřena aplikovatelnost nově vyvinuté metody stanovení 4-NP pomocí technik DCV a DPV na ls-CFE (postup přípravy viz kapitola 2.3). Kalibrační závislosti 4-NP byly proměřeny v koncentračních rozmezech  $(1-10) \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $(1-10) \cdot 10^{-6}$  mol/l (udávaná koncentrace odpovídá koncentraci 4-NP v modelovém vzorku pitné vody, každá koncentrace byla měřena na novém uhlíkovém filmu). Z důvodu dosažené nižší meze stanovitelnosti u techniky DPV jsou zde zobrazeny pouze tyto voltamogramy pro příslušná koncentrační rozmezí, a to na obr. 3.13 a 3.14. Všechny výsledné hodnoty pro techniku DCV jsou uvedeny v souhrnné tab. 3.4 na konci kapitoly 3.2.5.

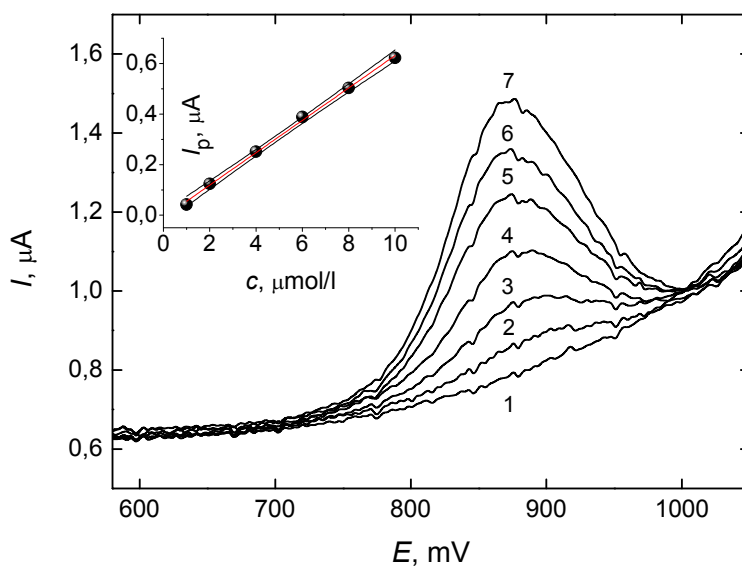
Některé kalibrační závislosti změřené v modelových vzorcích vod byly nelineární, avšak bylo je možné s vysokým korelačním koeficientem proložit polynomem druhého stupně (souhrnná tab. 3.4). Pokud bylo možné proložit oba měřené koncentrační řady dvěma přímkami, lišily se vzájemně jejich směrnice, přičemž vyšší směrnice byla vždy získána u nižšího koncentračního řádu. Toto chování vypovídá o možném vlivu adsorpce analytu na povrch pracovní elektrody.

Z uvedených výsledků vyplývá, že stanovení 4-NP v modelových vzorcích pitné vody vykazuje srovnatelnou citlivost i  $L_Q$  jako u stanovení 4-NP v samotném BR pufru (viz kapitola 3.2.3).



**Obr. 3.13**

DP voltamogramy 4-NP na ls-CFE (pitná voda s 4-NP – BR pufr o pH 7,0 (9:1)). Koncentrace 4-NP v pitné vodě: 0 (1) ;  $1 \cdot 10^{-5}$  (2) ;  $2 \cdot 10^{-5}$  (3) ;  $4 \cdot 10^{-5}$  (4) ;  $6 \cdot 10^{-5}$  (5) ;  $8 \cdot 10^{-5}$  (6) ;  $10 \cdot 10^{-5}$  (7) mol/l. Příslušná kalibrační závislost je zobrazena ve vloženém grafu



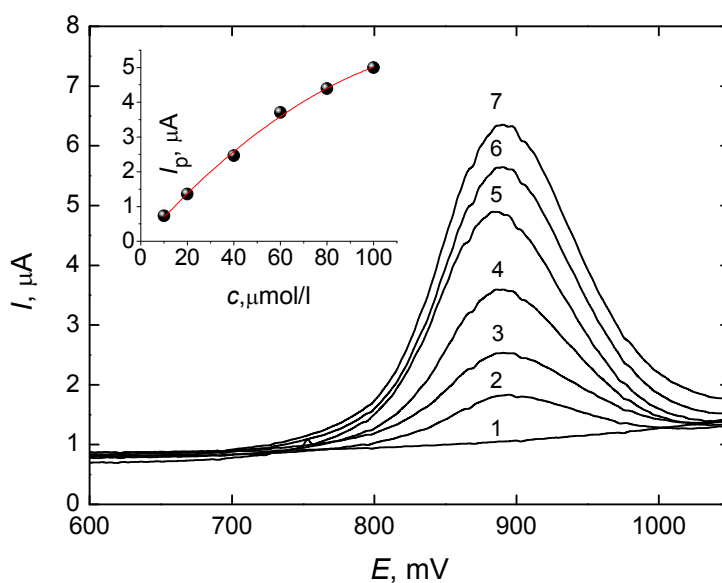
**Obr. 3.14**

DP voltamogramy 4-NP na ls-CFE (pitná voda s 4-NP – BR pufr o pH 7,0 (9:1)). Koncentrace 4-NP v pitné vodě: 0 (1) ;  $1 \cdot 10^{-6}$  (2) ;  $2 \cdot 10^{-6}$  (3) ;  $4 \cdot 10^{-6}$  (4) ;  $6 \cdot 10^{-6}$  (5) ;  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) ;  $10 \cdot 10^{-6}$  (7) mol/l. Příslušná kalibrační závislost je zobrazena ve vloženém grafu; konfidenční pásy sestaveny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  ( $n = 5$ )

### 3.2.5 Koncentrační závislost v modelových vzorcích říční vody

Na závěr byla ověřena aplikovatelnost metody stanovení 4-NP pomocí technik DCV a DPV na ls-CFE i v modelových vzorcích říční vody. Kalibrační závislosti 4-NP byly proměřeny za stejných podmínek jako v předchozích měřeních. Modelové vzorky říční vody (odebrané z Vltavy - lokalita Výtoň, Praha) byly připraveny přidáním odpovídajícího množství zásobního roztoku 4-NP do říční vody (postup přípravy viz kapitola 2.4).

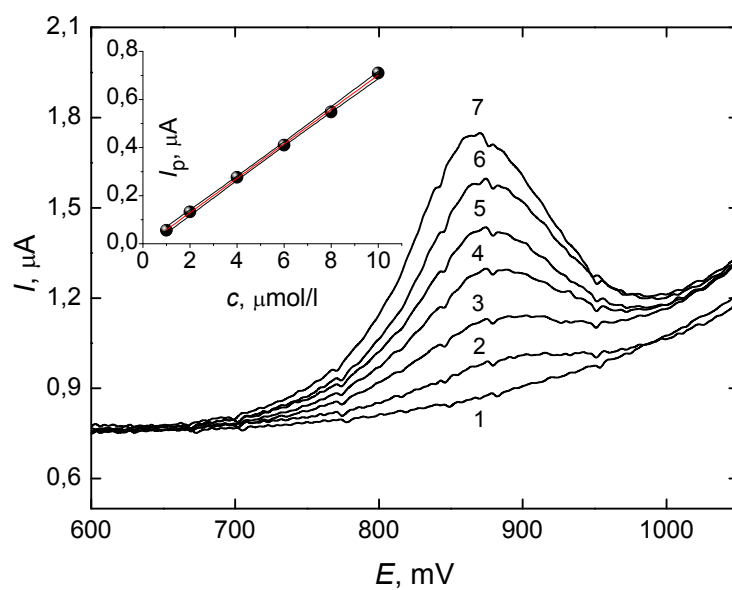
Na obr. 3.15 a 3.16. jsou opět zobrazeny pouze DV voltamogramy pro příslušná koncentrační rozmezí. Z obrázků je patrné, že u vyššího koncentračního řádu dochází ke změně průběhu kalibrační závislosti z lineárního na polynomický. Výsledné hodnoty pro obě techniky jsou uvedeny v souhrnné tab. 3.4 na konci této kapitoly. Výsledky získané při stanovení 4-NP v modelových vzorcích říční vody opět korespondují s hodnotami získanými při stanovení 4-NP v matrici deionizované vody.



**Obr. 3.15**

DP voltamogramy 4-NP na ls-CFE (říční voda s 4-NP – BR pufr o pH 7,0 (9:1)). Koncentrace 4-NP v říční vodě: 0 (1) ;  $1 \cdot 10^{-5}$  (2) ;  $2 \cdot 10^{-5}$  (3) ;  $4 \cdot 10^{-5}$  (4) ;  $6 \cdot 10^{-5}$  (5) ;  $8 \cdot 10^{-5}$  (6) ;  $10 \cdot 10^{-5}$  (7) mol/l. Příslušná kalibrační závislost je zobrazena ve vloženém grafu





**Obr. 3.16**

DP voltamogramy 4-NP na ls-CFE (říční voda s 4-NP – BR pufr o pH 7,0 (9:1)). Koncentrace 4-NP v říční vodě: 0 (1) ;  $1 \cdot 10^{-6}$  (2) ;  $2 \cdot 10^{-6}$  (3) ;  $4 \cdot 10^{-6}$  (4) ;  $6 \cdot 10^{-6}$  (5) ;  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) ;  $10 \cdot 10^{-6}$  (7) mol/l. Příslušná kalibrační závislost je zobrazena ve vloženém grafu; konfidenční pásy sestaveny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  ( $n = 5$ )

**Tab. 3.4**

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NP v prostředí BR pufru (deionizovaná voda jako ideální matrice) a v modelových vzorcích pitné a říční vody (o složení voda s 4-NP – BR pufr (9:1)) pomocí anodické voltametrie na ls-CFE; směrodatné odchylky hodnot směrnic a úseků jsou vypočteny pro  $n = 5$

Technika (matrice; pH BR pufru)	$c$ , mol/l	Směrnice, mA·l/mol	Úsek, μA	$R$	$L_Q$ , mol/l
DCV	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$84,8 \pm 2,9$	$1,63 \pm 0,18$	0,997	—
(dei. voda; 3,0)	$(6-10) \cdot 10^{-6}$	$242,5 \pm 8,9$	$-0,23 \pm 0,07$	0,999	$1,5 \cdot 10^{-6}$
DCV	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	— <sup>a,b</sup>	— <sup>a,b</sup>	— <sup>a,b</sup>	—
(pitná voda; 3,0)	$(4-10) \cdot 10^{-6}$	$88,8 \pm 4,4$	$0,82 \pm 0,03$	0,998	$1,6 \cdot 10^{-6}$
DCV	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$80,6 \pm 2,5$	$1,00 \pm 0,15$	0,998	—
(říční voda; 3,0)	$(6-10) \cdot 10^{-6}$	$111,5 \pm 1,2$	$0,67 \pm 0,01$	1,000	$1,7 \cdot 10^{-6}$
DPV	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$51,9 \pm 1,5$	$0,19 \pm 0,09$	0,998	—
(dei. voda; 7,0)	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$64,1 \pm 1,8$	$-0,01 \pm 0,01$	0,998	$4,6 \cdot 10^{-7}$
DPV	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	— <sup>a,c</sup>	— <sup>a,c</sup>	— <sup>a,c</sup>	—
(pitná voda; 7,0)	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$64,1 \pm 1,4$	$-0,10 \pm 0,08$	0,999	$4,6 \cdot 10^{-7}$
DPV	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	— <sup>a,d</sup>	— <sup>a,d</sup>	— <sup>a,d</sup>	—
(říční voda; 7,0)	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$71,5 \pm 0,9$	$-0,01 \pm 0,06$	0,999	$6,0 \cdot 10^{-7}$

<sup>a</sup> Koncentrační závislost s nelineárním průběhem vyjádřená formální polynomickou rovnicí, <sup>b</sup>  $I_p [\mu A] = (-290 \pm 110)c^2 [\text{mmol}^2/\text{l}^2] + (102 \pm 12)c [\text{mmol/l}] + (1,04 \pm 0,27)$  ( $R = 0,998$ ), <sup>c</sup>  $I_p [\mu A] = (-149 \pm 24)c^2 [\text{mmol}^2/\text{l}^2] + (61,0 \pm 2,7)c [\text{mmol/l}] + (0,02 \pm 0,06)$  ( $R = 1,000$ ), <sup>d</sup>  $I_p [\mu A] = (-248 \pm 49)c^2 [\text{mmol}^2/\text{l}^2] + (75,1 \pm 5,5)c [\text{mmol/l}] + (-0,03 \pm 0,12)$  ( $R = 0,999$ )

#### 4 PŘEDBĚŽNÁ SEPARACE A PREKONCENTRACE ANALYTU POMOCÍ EXTRAKCE TUHOU FÁZÍ

Pro separaci byly použity modelové vzorky deionizované, pitné a říční vody. Pro extrakci tuhou fází (SPE) byly použity kolonky LiChrolut EN (s množstvím sorbentu 200 mg a objemem 3 ml, Merck, SRN), které jsou dle údajů výrobce obzvláště vhodné pro extrakci pesticidů a fenolů ve vodě nebo léčiv v tělních tekutinách [75]. LiChrolut EN byl speciálně vyvinut pro použití v environmentální analýze, kde se vyskytují vysoce kontaminované vzorky a mají být analyzovány velmi polární organické sloučeniny. Vzhledem k extrémně velkému specifickému povrchu (přibližně 1200 m<sup>2</sup>/g podle BET-metody) je adsorpční kapacita pro polární organické látky (např. triaziny, fenoxycarboxylové kyseliny, fenoly, naftoly, aromatické nitrosloučeniny a aniliny) vynikající. Ve srovnání s LiChrolut RP-18, LiChrolut EN má desetkrát vyšší kapacitu, a proto 200 mg sorbentu je dostatečných pro reprodukovatelnou extrakci a má vysokou míru využití [75].

Kolonka byla napojena na extraktor, ten byl přes pojistnou nádobu spojen s pumpou, která zajišťovala podtlak. Podtlak byl kontrolován manometrem a byl udržován na 50 kPa. Připravené vzorky 4-NP v říční vodě byly před SPE přefiltrovány přes filtry MNGF-3 (průměr 50 mm, Macherey-Nagel, SRN).

SPE 4-NP z vodného roztoku byla prováděna následujícím postupem: kolonka byla aktivována promytím 9 ml methanolu a následně promyta 9 ml deionizované vody. Dále byl přes kolonku přesát modelový vzorek vody o objemu 100 ml obsahující přidaný 4-NP. Zachycený 4-NP byl eluován elučním činidlem přímo do 10-ml odměrné baňky. Eluent byl odpařen do sucha pod proudem dusíku. Poté byla odměrná baňka naplněna po rysku BR puřrem o pH 7,0 pro měření DP voltametrií a o pH 3,0 pro měření DC voltametrií. Roztok byl převeden do voltametrické nádoby a po promíchání byl zaznamenán voltamogram. Stejným způsobem byl připraven slepý pokus.

Procentuální výtěžek SPE byl určen z poměru  $I_p / I_{p0}$ , kde  $I_p$  je výška píku po SPE vodného roztoku 4-NP o příslušné koncentraci a  $I_{p0}$  je výška píku 4-NP v roztoku připraveném extrakcí slepého vzorku, k němuž byl po SPE přidán potřebný

objem zásobního roztoku 4-NP. Po nalezení vhodného eluentu byl celý postup pětkrát opakován a výsledný výtěžek SPE byl určen jako aritmetický průměr hodnot z poměrů  $I_p / I_{p0}$ .

#### 4.1 Optimalizace podmínek pro extrakci tuhou fází

Byly hledány optimální podmínky pro SPE 4-NP. Na rozdíl od SPE 2-nitrofenolu (2-NP), při které jsou získávány velmi vysoké výtěžky extrakce: 98 % [76], 100 % [77], jsou výtěžky 4-NP udávané v literatuře výrazně nižší, a to od 38-58 % [78] přes méně než 70 % [79-81], 81 % [77], 90 % [82], 92-106 % v závislosti na koncentraci [83], 93 % [84]. Cílem bylo nalézt takové podmínky, které by dávaly výtěžnost stanovení přes 95 %.

Prvotní optimalizace SPE byla zaměřena na nalezení vhodného typu extrakční kolonky. Nejprve byla testována kolonka LiChrolut RP-18E (s množstvím sorbentu 200 mg a objemem 3 ml, Merck, SRN). Tato kolonka nebyla vhodná a jako optimální byla posléze vybrána LiChrolut EN.

Dále bylo hledáno vhodné rozpouštědlo pro eluci analytu, které by splňovalo následující podmínky: dosažení vysokého výtěžku, malé množství potřebné k eluci a snadnost odpaření do sucha.

Do 100-ml odměrné baňky byl přidán odpovídající objem zásobního roztoku 4-NP (výsledná  $c = 1 \cdot 10^{-6}$  mol/l). 4-NP zachycený na kolonce byl postupně vymýván různými objemy methanolu do 10-ml odměrné baňky (viz tab. 4.1). Poté byly baňky doplněny methanolem po rysku a vzorky byly proměřeny spektrofotometricky. Pro objemy, u kterých byl získán výtěžek vyšší než 92 %, byl postup extrakce opakován, s tím rozdílem, že po eluci byl vzorek odpařen pod proudem dusíku do sucha, doplněn BR puforem o pH 7,0 a proměřen pomocí DPV. Dle článku [76] byla očekávána nejvyšší výtěžnost při objemu elučního činidla  $2 \times 3,0$  ml, ale z následujících výsledků je patrné, že toto množství není optimální.

**Tab. 4.1**

Výtěžnost extrakce v závislosti na objemu methanolu. Měřeno spektrofotometricky (UV-VIS) a technikou DPV

$V$ , ml	výtěžnost, % UV-VIS	výtěžnost, % DPV
1,0	48,21	—
2,0	59,47	—
2×1,0	87,81	—
3,0	85,45	—
3×1,0	88,12	—
4,0	90,43	—
4×1,0	94,15	84,36
5,0	101,55	82,69
5×1,0	103,55	93,49
2×3,0	100,64	84,18

Požadovaného procenta výtěžnosti bylo dosaženo až při použití 5 ml methanolu. Doba odpaření 5 ml methanolu je asi 45 minut, což neúměrně prodlužuje dobu analýzy, a proto bylo pro snížení organické fáze měření zopakováno při stejné koncentraci 4-NP, ale jako eluční činidlo byl použit aceton. Aceton není možné měřit spektrofotometricky, a proto byla opakována pouze druhá část postupu, a to odpaření pod proudem dusíku, doplněním BR pufru o pH 7,0 a změření technikou DPV. Dosažené výsledky měření jsou shrnuty v tab. 4.2.

**Tab. 4.2**

Výtěžnost extrakce v závislosti na objemu acetonu. Měřeno technikou DPV

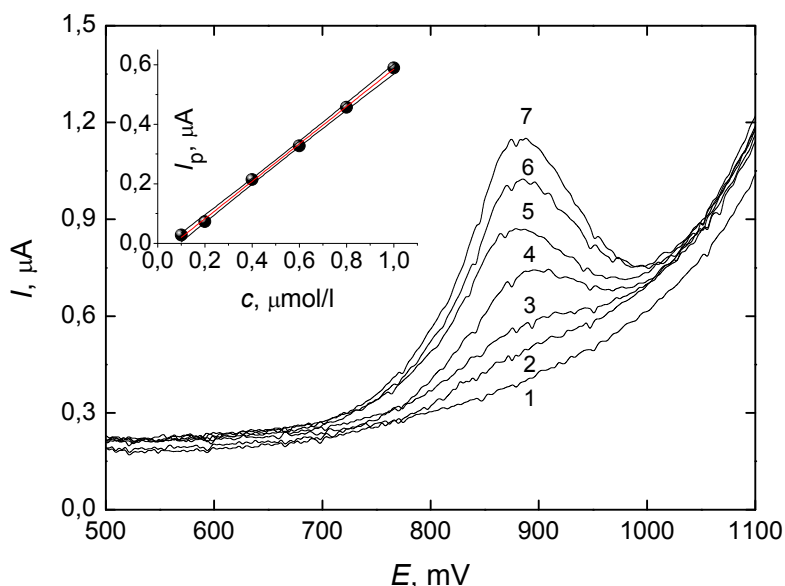
$V$ , ml	Výtěžnost, %
1,0	41,02
2,0	49,06
2×1,0	61,30
3,0	58,73
3×1,0	66,25
4,0	61,50
4×1,0	75,33
5,0	72,66
5×1,0	83,43

Z výsledků je patrné, že je dosahováno lepší výtěžnosti, pokud je eluční činidlo dávkováno po mililitrech s prosušením pod tlakem mezi jednotlivými přídávky, a to po dobu 1 min, a proto byl při dalších měřeních aplikován tento postup. Doba odpařování se výrazně zkrátila, ale bylo dosaženo nižších hodnot výtěžnosti. Dále byly testovány následující eluční činidla: 1,2-dichlorethan, diethylether, toluen a ethylester octové kyseliny. Jako optimální extrakční činidlo byl vybrán ethylester octové kyseliny a dávkovaný eluční objem 3×1,0 ml. Výsledná výtěžnost vypočítaná jako aritmetický průměr pěti měření činila  $(97,04 \pm 1,36) \%$  ( $s_r = 1,60 \%$ ).

## 4.2 Stanovení 4-nitrofenolu po extrakci tuhou fází

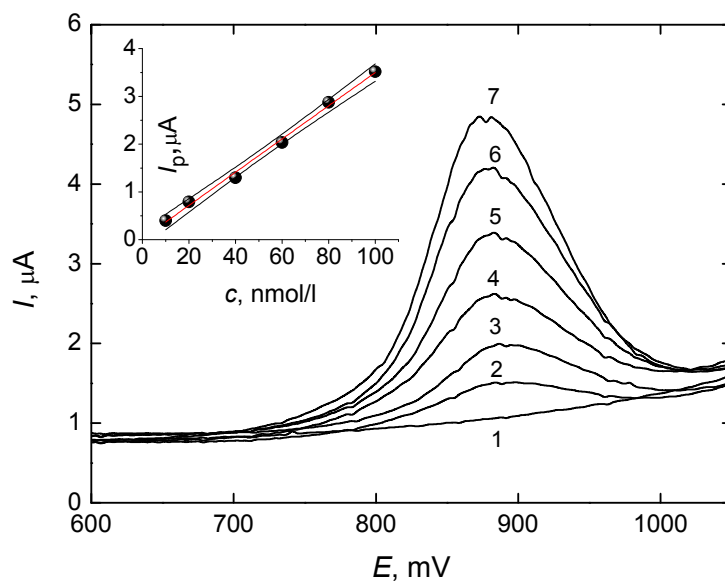
### 4.2.1 Extrakce 4-NP z deionizované vody s DPV stanovením

Nejprve byl optimální postup pro stanovení 4-NP pomocí SPE testován na vzorcích z deionizované vody, jakožto ideální modelové matrice. K zakoncentrování vzorku 4-NP byla použita technika SPE s následnou elucí 4-NP 3×1,0 ml ethylesteru octové kyseliny a odpařením pod proudem dusíku do sucha. Technikou DPV na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 7,0 bylo změřeno koncentrační rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l (obr. 4.1) (odpovídající kalibrační závislost po SPE je zobrazena ve vloženém grafu); při SPE došlo k zakoncentrování analytu ze 100 ml deionizované vody ( $c = 1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l 4-NP) do 10 ml ( $c = 1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l 4-NP), tedy teoretický prekoncentrační faktor  $k_{\text{teor}} = 10$ . Poté bylo stejnou metodou, ve stejném prostředí a za stejných podmínek změřeno koncentrační rozmezí  $1 \cdot 10^{-8}$  až  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l (obr. 4.2) s tím rozdílem, že při tomto měření došlo k zakoncentrování analytu ze 100 ml deionizované vody ( $c = 1 \cdot 10^{-8}$  až  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l 4-NP) do 1,0 ml ( $c = 1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l 4-NP) ( $k_{\text{teor}} = 100$ ). Parametry získaných kalibračních přímek jsou uvedeny v tab. 4.3.



**Obr. 4.1**

DP voltamogramy 4-NP na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 7,0. SPE ze 100 ml do 10 ml. Koncentrace 4-NP ve 100 ml deionizované vody: 0 (1) ;  $1 \cdot 10^{-7}$  (2) ;  $2 \cdot 10^{-7}$  (3) ;  $4 \cdot 10^{-7}$  (4) ;  $6 \cdot 10^{-7}$  (5) ;  $8 \cdot 10^{-7}$  (6) ;  $10 \cdot 10^{-7}$  (7) mol/l



**Obr. 4.2**

DP voltamogramy 4-NP na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 7,0. SPE ze 100 ml do 1 ml. Koncentrace 4-NP ve 100 ml deionizované vody: 0 (1) ;  $1 \cdot 10^{-8}$  (2) ;  $2 \cdot 10^{-8}$  (3) ;  $4 \cdot 10^{-8}$  (4) ;  $6 \cdot 10^{-8}$  (5) ;  $8 \cdot 10^{-8}$  (6) ;  $10 \cdot 10^{-8}$  (7) mol/l

**Tab. 4.3**

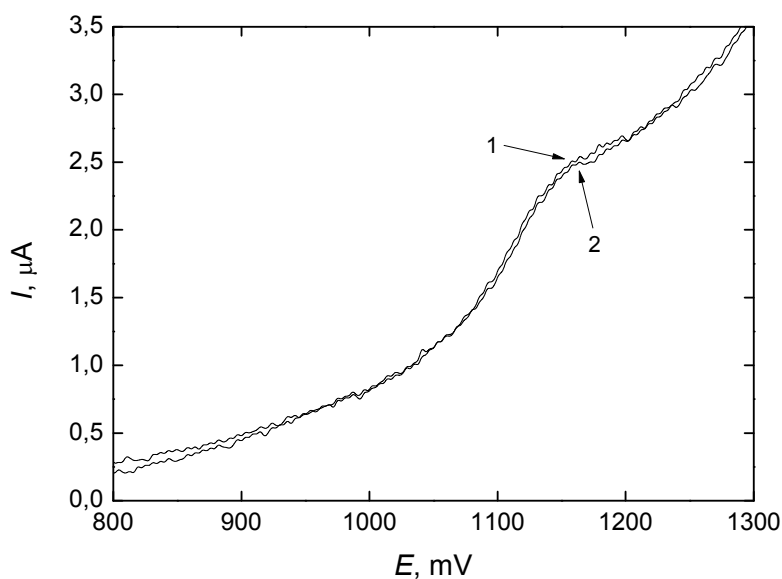
Parametry kalibračních přímk pro stanovení 4-NP na ls-CFE měřené technikou DPV v prostředí BR pufru o pH 7,0

$c$ , mol/l	Směrnice, $\text{mA} \cdot \text{l/mol}$	Úsek, $\mu\text{A}$	$R$	$L_Q$ , mol/l
<i>SPE ze 100 ml do 10 ml</i>				
$(1-10) \cdot 10^{-7}$	$62,84 \pm 1,04$	$-0,43 \pm 0,06$	0,999	$1,9 \cdot 10^{-7}$
<i>SPE ze 100 ml do 1 ml</i>				
$(1-10) \cdot 10^{-8}$	$414,39 \pm 12,30$	$-0,44 \pm 0,08$	0,998	$1,4 \cdot 10^{-8}$



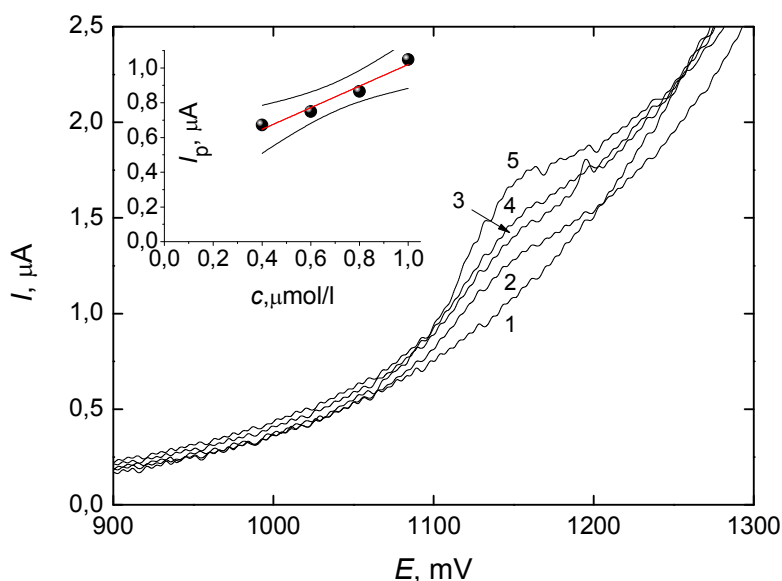
#### 4.2.2 Extrakce 4-NP z deionizované vody s DCV stanovením

Pro měření vzorku za pomoci DC voltametrie byl použit stejný postup extrakce jako u DP voltametrie, s tím rozdílem, že bylo měřeno v BR pufru o pH 3,0. Nejprve byla proměřena výtěžnost měření. Z pěti nezávislých měření byla vypočítána jako  $(99,18 \pm 0,60) \%$  ( $s_r = 0,69 \%$ ). Na obr. 4.3 je znázorněno překrývání křivek jedné dvojice měření: DC voltamogram bez SPE a po SPE. Výtěžnost je velmi vysoká, a proto bylo provedeno měření v deionizované vodě. Voltamogramy změřené v koncentračním rozmezí  $(4-10) \cdot 10^{-7}$  mol/l jsou znázorněny na obr. 4.4 (odpovídající kalibrační závislost po SPE je zobrazena ve vloženém grafu). Z důvodu špatně vyhodnotitelných vln při nižších koncentracích, nelineárního průběhu kalibrační křivky ( $R = 0,972$ ) a výrazně lepších výsledků při použití techniky DPV bylo od dalšího měření DC voltametrií upuštěno.



**Obr. 4.3**

DC voltamogramy 4-NP na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 3,0. SPE ze 100 ml do 10 ml. Koncentrace 4-NP ve 100 ml deionizované vody =  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Přímý přídavek 4-NP ke slepému vzorku (1) a extrakt 4-NP z vodného roztoku (2)



**Obr. 4.4**

DC voltamogramy 4-NP na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 3,0. SPE ze 100 ml do 10 ml. Koncentrace 4-NP ve 100 ml deionizované vody: 0 (1) ;  $4 \cdot 10^{-7}$  (2) ;  $6 \cdot 10^{-7}$  (3) ;  $8 \cdot 10^{-7}$  (4) ;  $10 \cdot 10^{-7}$  (5) mol/l

#### 4.2.3 Extrakce 4-NP z modelových vzorků pitné a říční vody

Pro ověření aplikovatelnosti metody stanovení 4-NP na ls-CFE pomocí SPE byly použity modelové vzorky pitné a říční vody. Do 100-ml odměrné baňky s pitnou či říční vodou byl přidán vhodný objem zásobního roztoku 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-6}$  mol/l).

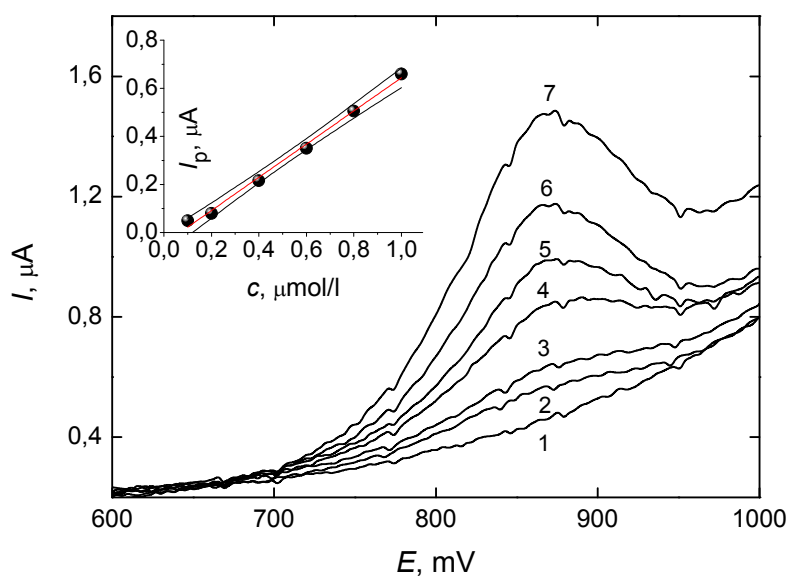
Při měření modelových vzorků pitné vody nebylo možné přesně použít získaný optimální postup pro SPE s následnou elucí 4-NP  $3 \times 1,0$  ml ethylesteru octové kyseliny a odpařením pod proudem dusíku do sucha jako u matrice deionizované vody, z důvodu nízkých výtěžků stanovení ( $\sim 10$  %). Byly zkoumány různé možnosti řešení tohoto problému a jako optimální bylo vybráno přidání 1,0 ml chelatonu 3 ( $c = 0,1$  mol/l) do 100-ml baňky spolu s požadovaným objemem zásobního roztoku 4-NP. Díky přidavku chelatonu 3 byl u takto připravených vzorků získán výtěžek ( $96,48 \pm 1,80$  %) ( $s_r = 2,13$  %,  $n = 5$ ).

Při měření modelových vzorků říční vody byly testovány postupy, které byly vybrány jako optimální při stanovení 4-NP s předřazenou SPE pro deionizovanou

a pitnou vodu. Při stanovení 4-NP bez přidavku chelatonu 3 bylo dosaženo výtěžnosti  $(76,80 \pm 3,07) \%$  ( $s_r = 4,56 \%$ ,  $n = 5$ ). Při měření DP voltamogramů po přidavku 1,0 ml chelatonu 3 ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ) do roztoku říční vody obsahující 4-NP byla získána výtěžnost  $(95,21 \pm 2,71) \%$  ( $s_r = 3,25 \%$ ,  $n = 5$ ).

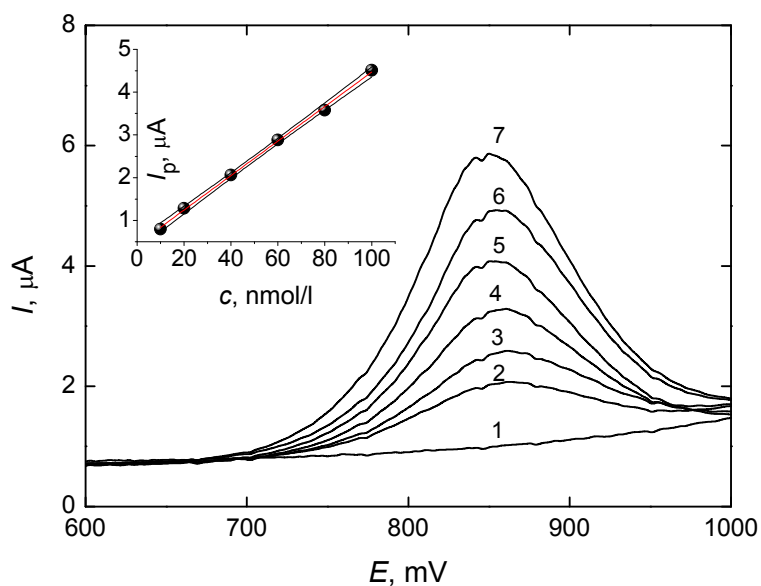
Technikou DPV na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 7,0 byly proměřeny voltamogramy po SPE z pitné vody a říční vody (obr. 4.5 a obr. 4.6). Stejným způsobem jako u deionizované vody byly připraveny slepé vzorky a získané hodnoty měření jsou uvedeny v tab. 4.4.

Veškeré naměřené výtěžnosti jsou znázorněny v souhrnné tab. 4.5.



**Obr. 4.5**

DP voltamogramy 4-NP na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 7,0. SPE ze 100 ml do 10 ml říční vody. Koncentrace 4-NP ve 100 ml říční vody: 0 (1) ;  $1 \cdot 10^{-7}$  (2) ;  $2 \cdot 10^{-7}$  (3) ;  $4 \cdot 10^{-7}$  (4) ;  $6 \cdot 10^{-7}$  (5) ;  $8 \cdot 10^{-7}$  (6) ;  $10 \cdot 10^{-7}$  (7) mol/l



**Obr. 4.6**

DP voltamogramy 4-NP na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 7,0. SPE ze 100 ml do 1 ml říční vody. Koncentrace 4-NP ve 100 ml říční vody: 0 (1) ;  $1 \cdot 10^{-8}$  (2) ;  $2 \cdot 10^{-8}$  (3) ;  $4 \cdot 10^{-8}$  (4) ;  $6 \cdot 10^{-8}$  (5) ;  $8 \cdot 10^{-8}$  (6) ;  $10 \cdot 10^{-8}$  (7) mol/l

**Tab. 4.4**

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NP na ls-CFE po SPE z modelového vzorku pitné a říční vody měřené technikou DPV v prostředí BR pufru o pH 7,0

$c$ , mol/l	Směrnice, $\text{mA} \cdot \text{l/mol}$	Úsek, $\mu\text{A}$	$R$	$L_Q$ , mol/l
<b>Extrakce z pitné vody</b>				
<i>SPE ze 100 ml do 10 ml</i>				
$(1-10) \cdot 10^{-7}$	$57,10 \pm 1,45$	$-0,17 \pm 0,08$	0,998	$2,2 \cdot 10^{-7}$
<i>SPE ze 100 ml do 1 ml</i>				
$(1-10) \cdot 10^{-8}$	$347,6 \pm 11,3$	$0,03 \pm 0,07$	0,997	$1,1 \cdot 10^{-8}$
<b>Extrakce z říční vody</b>				
<i>SPE ze 100 ml do 10 ml</i>				
$(1-10) \cdot 10^{-7}$	$68,99 \pm 2,54$	$-0,46 \pm 0,15$	0,997	$2,1 \cdot 10^{-7}$
<i>SPE ze 100 ml do 1 ml</i>				
$(1-10) \cdot 10^{-8}$	$403,68 \pm 72,46$	$0,43 \pm 0,04$	0,999	$1,0 \cdot 10^{-8}$

SPE se ukázala jako velmi vhodná metoda pro realizaci stanovení 4-NP v praxi; zde poskytne separaci a prekoncentraci analytu, a tím sníží hodnotu  $L_Q$ . Pomocí techniky SPE z deionizované vody i modelových vzorků pitné a říční vody byl 4-NP zkoncentrován ze 100 ml až do 1,0 ml ( $k_{\text{teor}} = 100$ ) a následným měřením metodou DPV bylo dosaženo až o dva koncentrační řády nižší hodnoty  $L_Q$  než bez využití SPE. Techniky SPE s následným měřením 4-NP pomocí techniky DPV lze využít pro environmentální praxi, kde je předpokládán výskyt 4-NP ve vodních systémech v submikromolárních koncentracích.

**Tab. 4.5**

Výtěžky stanovení 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-6}$ ,  $k_{\text{teor}} = 10$ ) na ls-CFE po SPE;  $n = 5$

Technika	Matrice	Výtěžek, %	$s_r$ , %
DCV	deionizovaná voda	99,18	0,69
DPV	deionizovaná voda	97,04	1,60
	pitná voda	96,48	2,13
	říční voda	95,21	3,25

## 5 CHARAKTERIZACE PRACOVNÍ ELEKTRODY

Mezi výhody ls-CFE, jež byly prakticky potvrzeny v bakalářské práci [5] i v této diplomové práci, patří především:

- 1) možnost jejího použití i v redukční oblasti potenciálového okna (výhoda oproti uhlíkovým pastovým elektrodám, jejichž použití v katodické oblasti komplikuje elektrochemicky redukovatelný kyslík přítomný v samotné uhlíkové pastě [85]),
- 2) rychlá a jednoduchá příprava elektrodového povrchu s vysokou opakovatelností jeho tvorby (především z hlediska konstantní hodnoty elektrochemicky aktivní plochy a elektrochemických vlastností obecně),
- 3) použití levných a lehce dostupných materiálů a
- 4) široké potenciálové okno v anodické i katodické oblasti potenciálů.

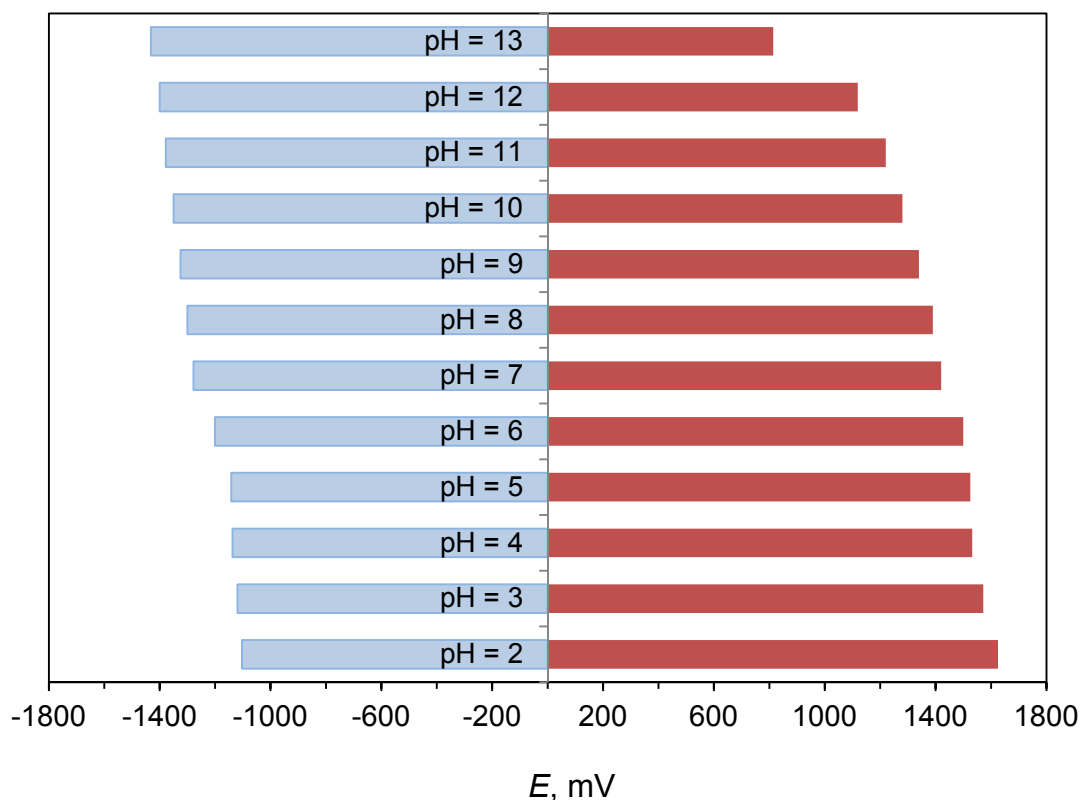
Některé výše uvedené vlastnosti ls-CFE byly také zkoumány a popsány v rámci předchozích kapitol této diplomové práce (např. opakovatelnost tvorby uhlíkového filmu v kapitole 3.2.2). Další charakterizace ls-CFE se stala předmětem následujících kapitol. Konkrétně se jedná o měření šířky využitelného potenciálového okna v prostředích o různých hodnotách pH (kapitola 5.1), detailní zobrazení elektrodového povrchu pomocí mikrofotografií (kapitola 5.2) a elektrochemickou charakterizaci elektrody pomocí modelových redoxních systémů  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  a  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  (kapitola 5.3).

### 5.1 Použitelnost pracovní elektrody v závislosti na rozsahu pH

Pro charakterizaci použití pracovní elektrody v závislosti na pH základního elektrolytu byly proměřeny šířky využitelných potenciálových oken. Byla připravena sada 12-ti roztoků obsahujících 10,0 ml BR pufru o proměnlivém pH, narůstajícím po jednotkách pH v rozsahu 2,0 až 13,0.

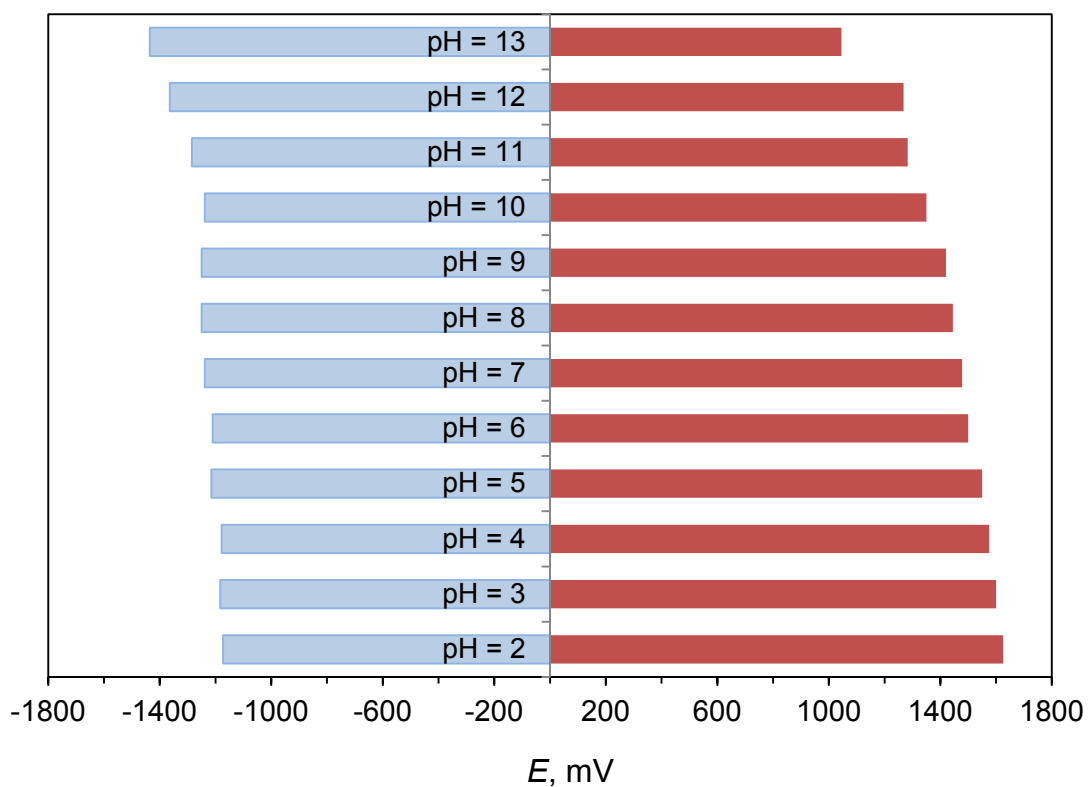
Tyto roztoky byly proměřeny technikami DCV a DPV v katodické i anodické oblasti potenciálového okna, a to na třech nově připravených filmech. Při měření

v katodické oblasti byl roztok před každým měřením probublán dusíkem po dobu 2 min. Při vyhodnocování šířky potenciálového okna byla brána jako hraniční hodnota proudu 20  $\mu\text{A}$ . Při této hodnotě proudu byla odečtena hodnota potenciálu. Ze tří naměřených hodnot byl vypočítán průměr a úsečky znázorňující šířku potenciálového okna byly zaneseny do obr. 5.1 pro techniku DCV a obr. 5.2 pro techniku DPV.



**Obr. 5.1**

Znázornění šířky potenciálových oken měřených na ls-CFE v prostředích BR pufru o proměnlivém pH technikou DCV. Hodnoty pH jsou znázorněny u příslušné úsečky



**Obr. 5.2**

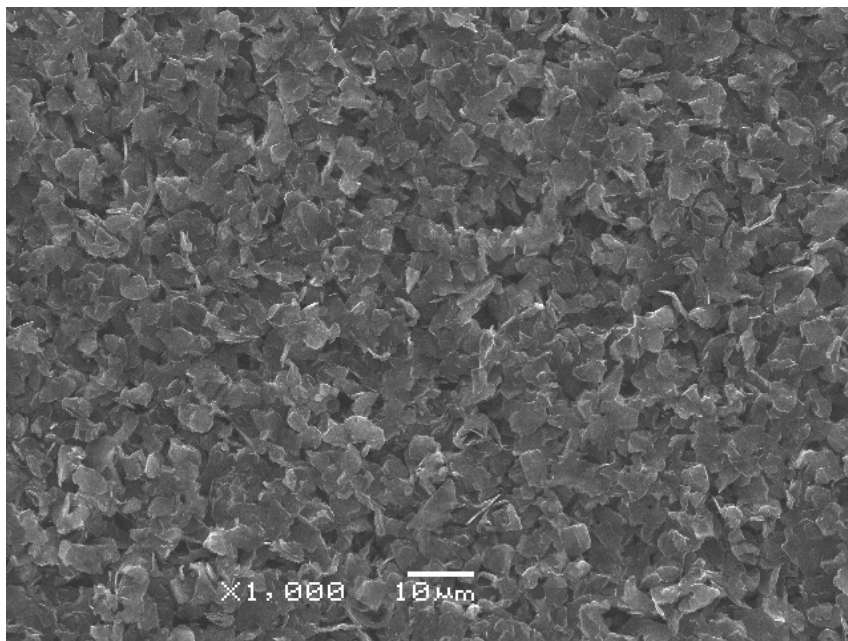
Znázornění šířky potenciálových oken měřených na ls-CFE v prostředích BR pufru o proměnlivém pH technikou DPV. Hodnoty pH jsou znázorněny u příslušné úsečky



## 5.2 Fotografie povrchu Is-CFE zhotovené pomocí elektronového mikroskopu

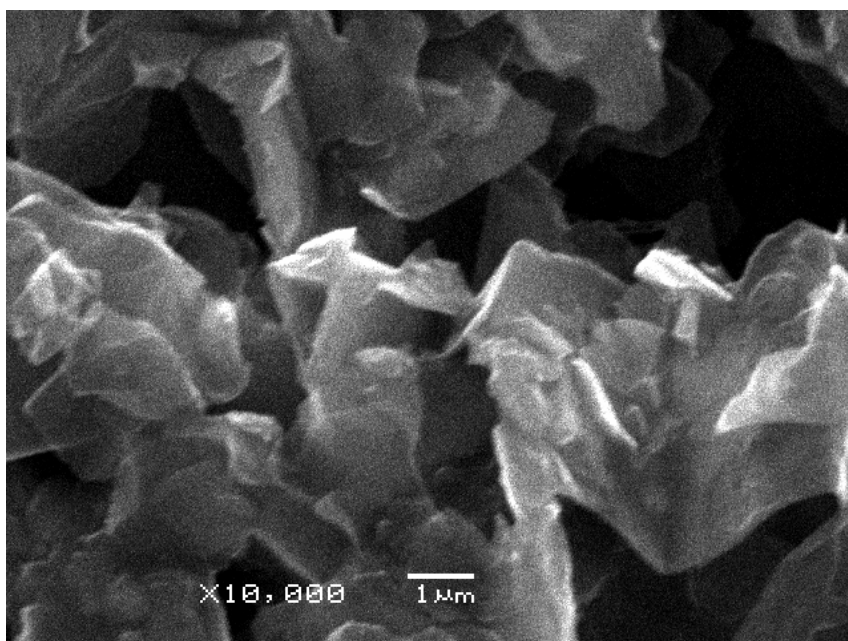
Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) byly pořízeny fotografie povrchu uhlíkového filmu. SEM je přístroj určený k pozorování povrchů nejrůznějších objektů a je ho možné považovat za analogii světelného mikroskopu využívajícího dopadající světlo. Na rozdíl od světelného mikroskopu je výsledný obraz tvořen pomocí sekundárního signálu – odražených nebo sekundárních elektronů – a tato metoda zobrazení je považována za nepřímou metodu. Velkou předností SEM je jeho velká hloubka ostrosti, takže se dvojrozměrné fotografie ze SEM mohou jevit trojrozměrně. Kromě názvu skenovací se v literatuře používá i označení rastrovací nebo řádkovací elektronový mikroskop [86].

Na plastovou folii byla pomocí automatické pipety nanесena kapka uhlíkového inkoustu o objemu 10  $\mu\text{l}$ . Po zaschnutí byla folie nalepena na terčík a proměřena pomocí SEM. Z obr. 5.3 je patrné, že povrch uhlíkového filmu představuje poměrně homogenně uspořádanou soustavu grafitových zrn (či krystalů), jejichž průměrná velikost se pohybuje okolo 5  $\mu\text{m}$ . Při bližším pohledu (obr. 5.4) je zřejmé, že jednotlivá zrnka mikromletého grafitu tvoří prostorový systém kavit vzniklý inkorporací zrn do polystyrenového pojiva. Z faktu, že ani po vytvoření filmu ani při jeho následném používání nebyla pozorována žádná jeho viditelná mechanická degradace, lze usuzovat, že jednotlivá zrnka jsou mezi sebou fixována právě použitým polystyrenovým pojivem, a tudíž lze předpokládat, že jistá část elektrochemicky aktivního povrchu je takto odizolována. Pro zjištění elektrochemicky aktivní plochy elektrody byla použita technika CV a výpočet pomocí Randels-Ševčíkovy rovnice (rovnice 5.1, kapitola 5.3.1).



**Obr. 5.3**

Fotografie povrchu uhlíkového filmu zhotovená pomocí SEM. Zvětšeno 1000×



**Obr. 5.4**

Fotografie povrchu uhlíkového filmu zhotovená pomocí SEM. Zvětšeno 10 000×

## 5.3 Cyklická voltametrie

Pro elektrochemickou charakterizaci elektrodového povrchu a popis reakčního mechanismu 4-NP [87] byla použita technika CV na ls-CFE a podkladové platinové diskové elektrodě. Díky CV je možné získat informace o elektrochemickém ději, který na elektrodě probíhá, a jeho kinetických parametrech. Základními nastavitelnými veličinami této techniky jsou počáteční a koncový potenciál a rychlost polarizace. Elektrodový děj může být reverzibilní, kvazi-reverzibilní nebo ireverzibilní [24].

### 5.3.1 Výpočet aktivní plochy ls-CFE pomocí CV

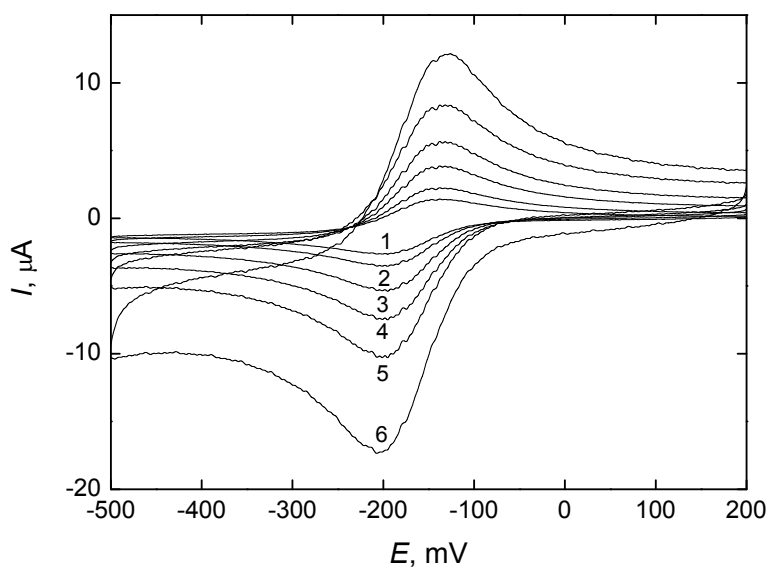
V roztoku 0,1 mol/l KCl obsahujícím  $K_3[Fe(CN)_6]$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) byly proměřeny cyklické voltamogramy. Pro rychlosti polarizace 5, 10, 20, 50, 100, 200 a 500 mV/s byly vždy proměřeny tři skeny, a to nejprve přes redukční oblast, kde dochází k redukci hexakynoželezitanového aniontu na aniont hexakynoželeznatanový. Na kovových elektrodách tento proces probíhá reverzibilně, na jiných elektrodách, například elektrodě ze skelného uhlíku, probíhá kvazireverzibilně [24]. Redoxní systém  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  je jedním z elektrochemických standardů. K výpočtu velikosti proudu píků u reverzibilního elektrochemického děje slouží Randles-Ševčíkova rovnice (rovnice 5.1) [24].

$$I_{p,k} = I_{p,a} = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n_{el}^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot c \cdot v^{1/2} \quad (5.1)$$

kde:	$I_{p,k}$	proud katodického píku [A]
	$I_{p,a}$	proud anodického píku [A]
	$n_{el}$	počet vyměňovaných elektronů
	$A$	plocha elektrody [cm <sup>2</sup> ]
	$D$	difuzní koeficient [cm <sup>2</sup> /s]
	$c$	molární koncentrace [mol/ml]
	$v$	rychlost polarizace [V/s]

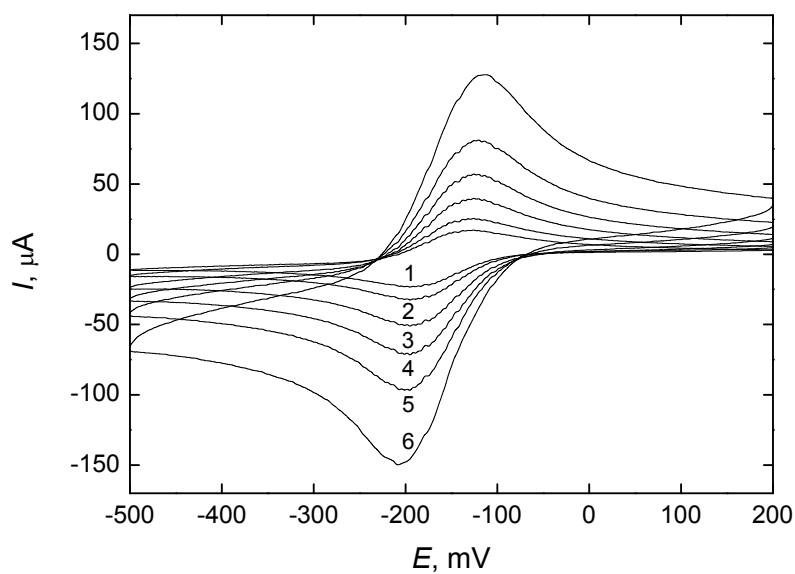
Tento systém byl proměřen na podkladové platinové elektrodě a ls-CFE. Přestože se teoreticky jedná o systém, u kterého je očekávaný reverzibilní elektroodový děj řízený pouze difuzí, hodnota směrnice závislosti  $\log |I_p|$  na  $\log v$  v uvedeném rozsahu rychlostí polarizace činila 0,42 na podkladové platinové elektrodě a 0,37 na ls-CFE (teoretická hodnota směrnice pro děj kontrolovaný difuzí je 0,5), což pravděpodobně souvisí s mírnou odchylkou od reverzibilního chování, kdy je elektrochemický děj na povrchu elektrody z části řízen přenosem hmoty a z části kinetikou přenosu náboje [24]. Proto byl změřen i jiný redoxní systém, a to  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ .

V roztoku 0,1 mol/l KCl obsahujícím  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) byly proměřeny cyklické voltamogramy. Pro rychlosti polarizace 5, 10, 20, 50, 100, 200 a 500 mV/s byly vždy proměřeny tři skeny, a to nejprve přes redukční oblast, kde dochází k redukci  $\text{Ru}^{\text{III}}$  na  $\text{Ru}^{\text{II}}$ . Při zpětném skenu dochází k reoxidaci. U obou systémů se teoreticky jedná o jednoelektronovou reverzibilní výměnu řízenou difuzí, a proto by měla být výška píků v katodické i anodické oblasti stejná (poměr  $I_{p,k}/I_{p,a} \approx 1,0$ ), poloha  $E_{p,k}$  a  $E_{p,a}$  by měla být nezávislá na rychlosti skenu a rozdíl mezi  $E_{p,k}$  a  $E_{p,a}$  by měl činit 59 mV (v praxi jsou považovány za reverzibilní i voltamogramy, u kterých je separace píků do 70 mV [24]). Na obr. 5.5 jsou znázorněny cyklické voltamogramy  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  na podkladové platinové elektrodě a na obr. 5.6 jsou znázorněny cyklické voltamogramy  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  na ls-CFE při narůstajících rychlostech polarizace.



**Obr. 5.5**

Cyklické voltamogramy  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v roztoku KCl ( $c = 0,1$  mol/l) na podkladové platínové elektrodě. Zobrazen vždy druhý sken. Rychlost polarizace: 10 (1) ; 20 (2) ; 50 (3) ; 100 (4) ; 200 (5) ; 500 (6) mV/s. Měřeno od -500 mV do 200 mV a zpět



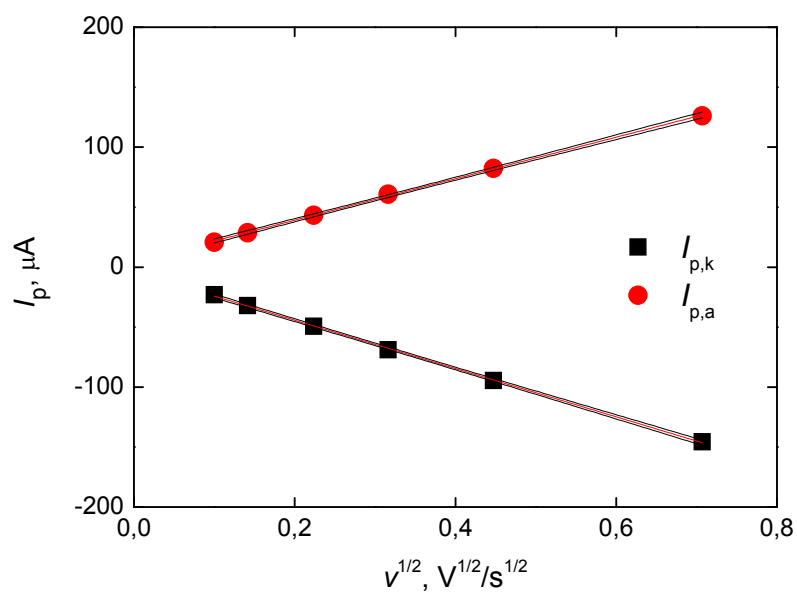
**Obr. 5.6**

Cyklické voltamogramy  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v roztoku KCl ( $c = 0,1$  mol/l) na 1s-CFE. Zobrazen vždy druhý sken. Rychlost polarizace: 10 (1) ; 20 (2) ; 50 (3) ; 100 (4) ; 200 (5) ; 500 (6) mV/s. Měřeno od -500 mV do 200 mV a zpět

Pro zjištění, zda je elektrochemický děj řízen difúzí, byla vynesena závislost hodnoty proudu píku ( $I_p$ ) na odmocnině rychlosti polarizace ( $v^{1/2}$ ). Pokud je závislost  $I_p$  na  $v^{1/2}$  lineární, potom je elektrochemický děj řízen difúzí [24]. Dále byly vyneseny závislosti  $\log |I_p|$  na  $\log v$ . Směrnice obou těchto přímk se blížila k očekávané hodnotě 0,5, a to jak na podkladové platinové elektrodě (0,47), tak na ls-CFE (0,47), čímž bylo potvrzeno, že děj je řízen difúzí i na nově připravené ls-CFE. Grafy obou závislostí jsou znázorněny na obr. 5.7 a obr. 5.8.

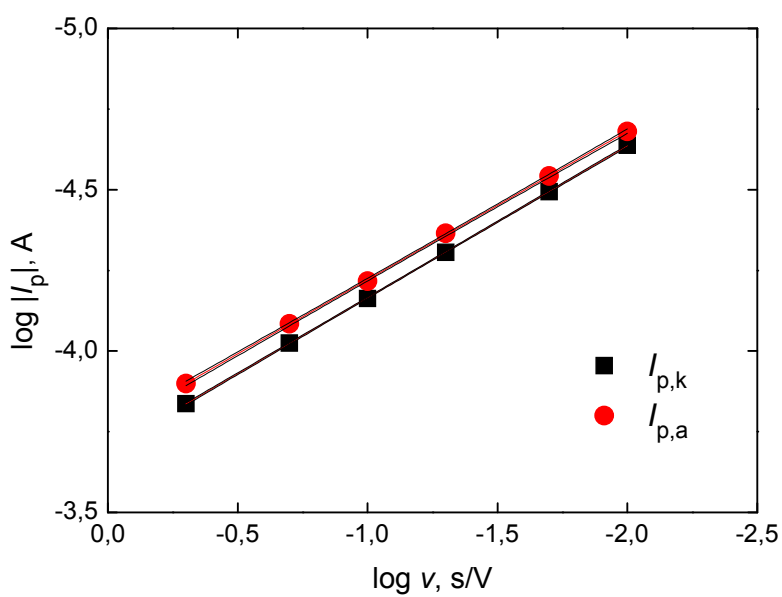
Pro výpočet aktivní plochy ls-CFE byl nejprve vypočítán difuzní koeficient získaný z hodnot pro  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  na podkladové platinové elektrodě. Jako aktivní plocha elektrody byla brána vypočítaná matematická plocha  $3,14 \text{ mm}^2$ . Difuzní koeficient byl vypočten jako  $5,63 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ . S touto hodnotou difuzního koeficientu byla vypočítána aktivní plocha ls-CFE, a to  $31,6 \text{ mm}^2$ , což v porovnání s matematickou plochou  $38,5 \text{ mm}^2$  (geometrický průměr používané elektrody byl  $7,0 \text{ mm}$ ) činí 82,1 %.

Vypočítaný poměr proudu píků  $I_{p,k}$  a  $I_{p,a}$  je 1,1 při rychlosti polarizace  $20 \text{ mV/s}$  a rozdíl potenciálů píků  $E_{p,k}$  a  $E_{p,a} = -57 \text{ mV}$  (při stejné rychlosti polarizace) při CV v systému  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  měřeném na ls-CFE. Tyto výsledky vypovídají o tom, že ls-CFE poskytuje téměř ideální elektrochemické chování vůči tomuto modelovému redoxnímu indikátoru.



**Obr. 5.7**

Závislost  $I_p$  na  $v^{1/2}$  pro  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v roztoku KCl ( $c = 0,1$  mol/l) na ls-CFE pro katodickou (■) i anodickou (●) oblast potenciálového okna



**Obr. 5.8**

Závislost  $\log I_p$  na  $\log v$  pro  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v roztoku KCl ( $c = 0,1$  mol/l) na ls-CFE pro katodickou (■) i anodickou (●) oblast potenciálového okna

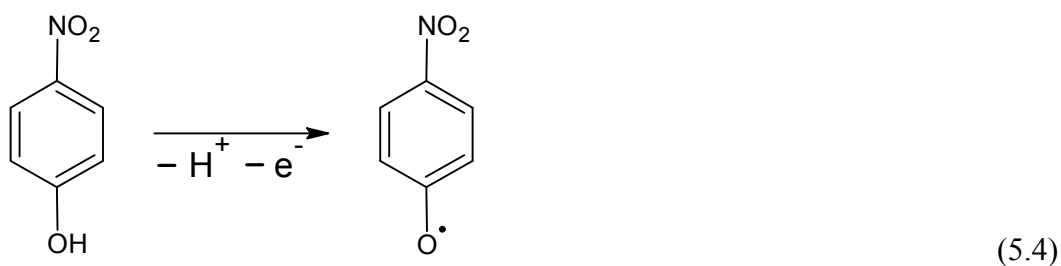
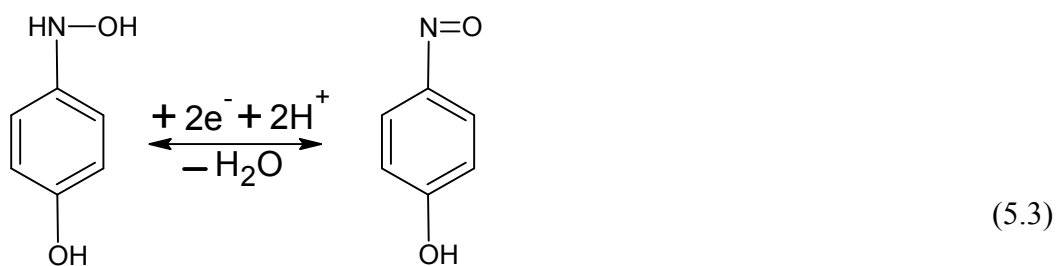
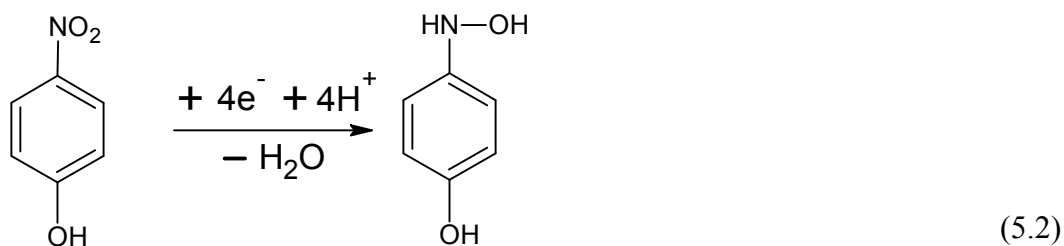
### 5.3.2 Studování mechanismu elektrochemické přeměny 4-NP na ls-CFE

Cyklické voltamogramy 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) byly měřeny v prostředích BR pufru o pH 2,0; 7,0 a 13,0 reprezentujících kyselé, neutrální a zásadité prostředí při různém nastavení rychlosti polarizace: 5, 10, 20, 50, 100, 200 a 500 mV/s. Pro zjištění, zda je elektrochemický děj řízen difúzí, byla vynesena závislost hodnoty proudu píku ( $I_p$ ) na odmocnině rychlosti polarizace ( $v^{1/2}$ ). Pokud je závislost  $I_p$  na  $v^{1/2}$  lineární, potom je elektrochemický děj řízen difúzí [24].

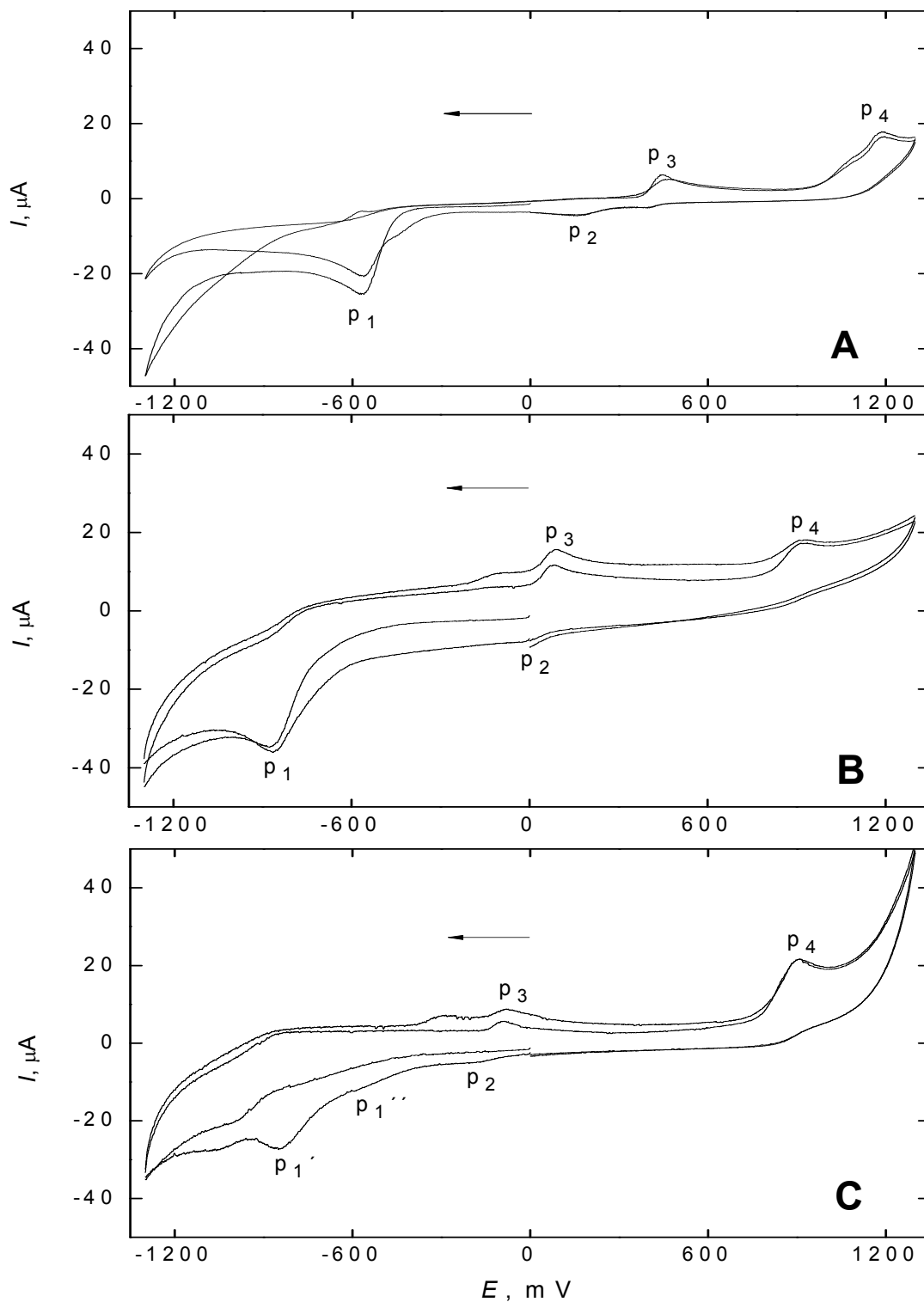
Cyklické voltamogramy 4-NP na ls-CFE jsou znázorněny na obr. 5.9, kde část A reprezentuje kyselé prostředí, část B neutrální a část C zásadité prostředí. Ve všech třech částech se objevují minimálně čtyři píky, v části C pak píků pět. Pík  $p_1$  odpovídá čtyřelektronové ireverzibilní katodické redukci nitro skupiny za vzniku hydroxylaminoskupiny (schéma 5.2), která je ve zpětném skenu reverzibilně anodicky oxidována za účasti dvou elektronů a dvou protonů na nitrososkupinu (redoxní pár reprezentovaný píky  $p_3$  a  $p_2$ , schéma 5.3) [73]. Tímto mechanismem bude probíhat redukce nitroskupiny v kyselém, neutrálním i slabě alkalickém prostředí (jak plyne z tabulky 5.1 a obr. 5.10, je rychlost tohoto děje za daných podmínek řízena difúzí), zatímco v prostředí silně zásaditém (část C obr. 5.9) je možné pozorovat redukci nitroskupiny probíhající ve dvou krocích (píky  $p_1'$  a  $p_1''$ ). V prvním kroku vzniká po přijetí jednoho elektronu z povrchu elektrody nitroanion radikál ( $p_1'$ ), který je posléze redukován pomocí tří elektronů a čtyř protonů na hydroxylaminoskupinu ( $p_1''$ ) [88].

Na obr. 5.9 je rovněž ve všech třech prostředích patrný dobře vyvinutý anodický pík  $p_4$ , který odpovídá ději (jeho rychlost je opět řízena difúzí, jak to plyne z tab. 5.1 a obr. 5.11), při kterém vznikají dimerní a polymerní filmy polyfenolového (či polyfenylenoxidového) typu prostřednictvím radikálové oxidace odebráním dvou elektronů a dvou protonů na jeden dimer (schéma 5.4) [73].



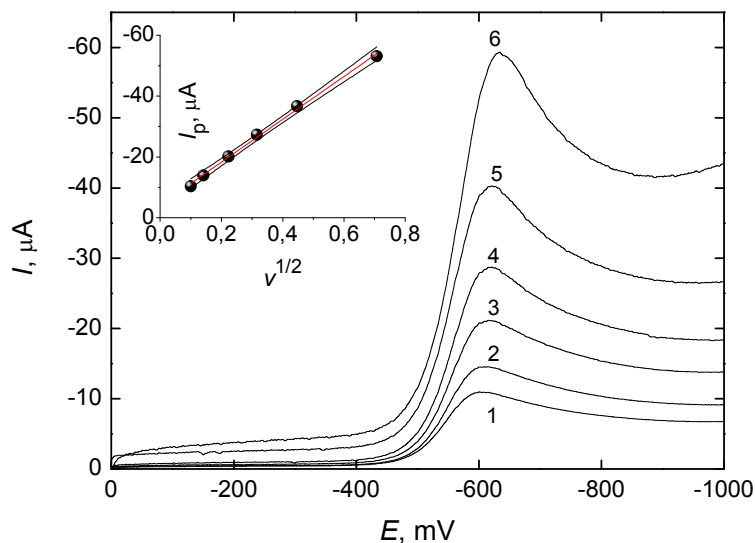


Z uvedeného vyplývá, že jsou tři možnosti detekce 4-NP ve vodném prostředí. Přímou pomocí píků  $p_1$  a  $p_4$  a nepřímou prostřednictvím píku  $p_3$ . Pík  $p_2$  je často příliš malý kvůli nízké stabilitě nitroso derivátů [73]. Píky  $p_1'$  a  $p_1''$  v katodické oblasti potenciálů při měření v prostředí o pH 12,0 nebylo možné spolehlivě vyhodnotit. Z výsledků je patrné, že ani pík  $p_4$  v anodické oblasti potenciálů při tomto pH neposkytuje ideální výsledky, protože dochází k odklonu hodnoty směrnice log–log závislosti od ideální hodnoty 0,5 pro difuzí řízený děj (tab. 5.1).



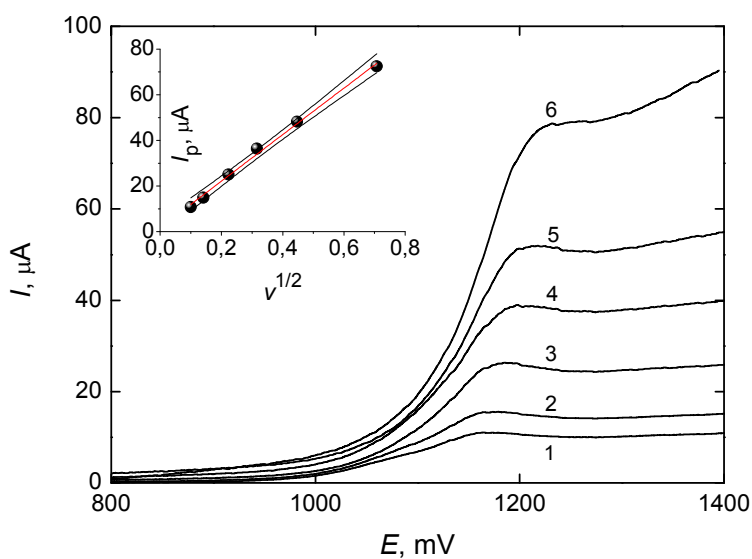
**Obr. 5.9**

Cyklické voltamogramy 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na ls- CFE v prostředí BR pufru o pH 2,0 (A) ; 7,0 (B) ; 12,0 (C). Šipka znázorňuje směr nárůstu potenciálu dopředného skenu. Rychlost polarizace 50mV/s. Bližší popis jednotlivých voltametrických píků je uveden v textu



**Obr. 5.10**

Katodická oblast cyklických voltamogramů (1. sken) 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 2,0. Rychlost polarizace: 10 (1) ; 20 (2) ; 50 (3) ; 100 (4) ; 200 (5) ; 500 (6) mV/s. Závislost výšky píků na odmocnině rychlosti polarizace je znázorněna ve vloženém grafu



**Obr. 5.11**

Anodická část cyklických voltamogramů (1. sken) 4-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 2,0. Rychlost polarizace: 10 (1) ; 20 (2) ; 50 (3) ; 100 (4) ; 200 (5) ; 500 (6) mV/s. Závislost výšky píků na odmocnině rychlosti polarizace je znázorněna ve vloženém grafu

**Tab. 5.1**

Parametry lineárních závislostí  $I_p$  na  $v^{1/2}$  a  $\log I_p$  na  $\log v$  při charakterizaci elektrochemického chování 4-NP na ls-CFE technikou CV

pH, oblast pot. okna	Závislost	Směrnice	Úsek	<i>R</i>
2,0 katodická	$I_p$ vs. $v^{1/2}$	$-70,4 \pm 1,1$	$-4,20 \pm 0,70$	-0,998
	$\log  I_p $ vs. $\log v$	$0,4192 \pm 0,0022$	$-4,1465 \pm 0,0029$	1,000
2,0 anodická	$I_p$ vs. $v^{1/2}$	$101,9 \pm 3,4$	$1,75 \pm 0,13$	0,997
	$\log I_p$ vs. $\log v$	$0,494 \pm 0,014$	$-3,972 \pm 0,018$	0,998
7,0 katodická	$I_p$ vs. $v^{1/2}$	$-95,8 \pm 2,2$	$-5,80 \pm 0,83$	-0,999
	$\log  I_p $ vs. $\log v$	$0,4175 \pm 0,0034$	$-4,0130 \pm 0,0045$	1,000
7,0 anodická	$I_p$ vs. $v^{1/2}$	$53,8 \pm 1,0$	$0,80 \pm 0,39$	0,999
	$\log I_p$ vs. $\log v$	$0,4780 \pm 0,0085$	$-4,268 \pm 0,011$	0,999
12,0 anodická	$I_p$ vs. $v^{1/2}$	$52,1 \pm 1,8$	$9,19 \pm 0,67$	0,997
	$\log I_p$ vs. $\log v$	$0,3860 \pm 0,0080$	$-4,216 \pm 0,010$	0,999

Jednotky směrnice pro závislost  $I_p$  vs.  $v^{1/2}$  jsou  $\mu\text{A}\cdot\text{s}^{1/2}/\text{V}^{1/2}$  a jednotky úseku jsou  $\mu\text{A}$ .  
Jednotky směrnice pro závislost  $\log I_p$  vs.  $\log v$  jsou  $\log(\mu\text{A})/\log(\text{s}/\text{V})$  a jednotky úseku jsou  $\log(\mu\text{A})$

## 6 SHRNUÍ VÝSLEDKŮ A ZÁVĚR

V této diplomové práci bylo prostudováno elektrochemické chování 4-nitrofenolu (4-NP) a za nalezených optimálních podmínek bylo provedeno jeho stanovení převážně v anodické oblasti potenciálového okna pomocí DC voltametrie (DCV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV) na nově připravené velkoplošné uhlíkové filmové elektrodě (ls-CFE). Jako optimální prostředí pro tyto techniky bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 3,0 (pro DCV) a pH 7,0 (pro DPV). Elektrochemické chování 4-NP na ls-CFE v katodické oblasti potenciálového okna bylo detailně popsáno v autorčině předchozí bakalářské práci [5].

Opakovatelnost stanovení 4-NP na ls-CFE za optimálních podmínek byla měřena na sérii dvaceti po sobě následujících anodických skenů. Při koncentraci analytu  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l docházelo ke značné pasivaci elektrodového povrchu, avšak optimální možnost elektrochemické regenerace elektrodového povrchu nebyla nalezena. Bylo tedy přistoupeno k měřením jednotlivých sérií záznamů vždy na novém uhlíkovém filmu a byla měřena opakovatelnost nanášení filmů pro deset nově připravených filmů. Zde byla využita jedna z hlavních předností tohoto konceptu ls-CFE, a to snadné a rychlé obnovitelnosti povrchu mechanickým otřením. Relativní směrodatná odchylka  $I_p$  činila 3,7 % pro DCV na ls-CFE a 3,6 % pro DPV na ls-CFE. Kalibrační závislosti 4-NP byly proměřeny v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l a nově vyvinuté metody byly úspěšně aplikovány při stanovení 4-NP v modelových vzorcích pitné a říční vody. Měřená koncentrační rozmezí a získané hodnoty  $L_Q$  jsou shrnuty v tab. 6.1.

Dále byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení 4-NP s předřazenou extrakcí na tuhou fázi (SPE) s následným měřením metodou DPV na ls-CFE v prostředí BR pufru o pH 7,0: použití kolonek LiChrolut EN (s množstvím sorbentu 200 mg a objemem 3 ml), aktivace kolonky 9,0 ml methanolu a 9,0 ml deionizované vody následovaná prosátím modelového vzorku 4-NP a elucí  $3 \times 1,0$  ml ethylesteru octové kyseliny. Aplikovatelnost takto vyvinuté metody stanovení 4-NP byla ověřena na modelových vzorcích pitné a říční vody. Měřená koncentrační rozmezí a získané hodnoty mezi stanovitelnosti ( $L_Q$ ) jsou shrnuty v tab. 6.1. SPE se ukázala jako velmi vhodná metoda pro realizaci stanovení 4-NP v praxi; zde poskytne separaci

a prekoncentraci analytu, a tím sníží hodnotu  $L_Q$ . Pomocí metody SPE z deionizované, pitné i říční vody byl 4-NP zkoncentrován ze 100 ml až do 1,0 ml (teoretický prekoncentrační faktor  $k_{\text{teor}} = 100$ ) a následným měřením metodou DPV bylo dosaženo až o dva koncentrační řády nižší hodnoty  $L_Q$  než bez využití SPE. Při všech měřeních bylo dosaženo velmi vysokého výtěžku stanovení. U deionizované vody výtěžek přesahoval 97 % pro obě techniky a dokonce i ve vzorcích říční vody činil více než 95 %.

Rovněž byla v rámci této diplomové práce provedena mikroskopická a elektrochemická charakterizace použité elektrody a v neposlední řadě bylo zkoumáno elektrochemické chování 4-NP na této elektrodě pomocí cyklické voltametrie (CV). Byl sledován rozsah potenciálů, ve kterých je ls-CFE použitelná a bylo zjištěno, že v celém rozsahu pH (2,0 až 13,0) poskytuje použitelné potenciálové okno o šířce minimálně 2,5 V. Technikou CV na ls-CFE bylo v prostředí BR pufru (pH 2,0; 7,0 a 13,0) zjištěno, že v rozsahu polarizačních rychlostí 10-500 mV/s jsou závislosti proudu píku 4-NP na odmocnině z rychlosti polarizace lineární a směrnice závislosti  $\log |I_p|$  na  $\log v$  při pH 2,0 a 7,0 vykazovala hodnotu blízkou 0,5. Pro pH 12,0 již nedosahovala této hodnoty. V tomto rozsahu polarizačních rychlostí jsou tedy rychlosti oxidačních i redukčních dějů probíhajících na povrchu pracovní elektrody řízeny difuzí.

Výpočtem byla zjištěna aktivní plocha elektrody, a to 82,1 % z teoretické hodnoty geometrické plochy disku těla elektrody. Nebylo dosaženo hodnoty 100 % pravděpodobně z důvodu obsahu polystyrenového pojiva, které může jistou část elektrodového povrchu izolovat. Uhlíková komponenta má větší hustotu než pojivo a při způsobu nanášení filmu pipetou na elektrodu obrácenou elektrodovou plochou vzhůru uhlíkové zrnka klesnou ve vyšší míře dolů. Proto je část krystalků uhlíku překryta pojivem při kontaktu s měřeným roztokem a dojde k snížení aktivní plochy elektrody.

**Tab. 6.1**

Koncentrační rozmezí a vypočítané meze stanovitelnost 4-NP na ls-CFE pomocí metod DCV a DPV v anodické oblasti potenciálového okna

Technika	Matrice	Koncentrační rozmezí, mol/l	$L_Q$ , mol/l
DCV	deionizovaná voda	$(6-100) \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$
	pitná voda	$(4-100) \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-6}$
	říční voda	$(6-100) \cdot 10^{-6}$	$1,7 \cdot 10^{-6}$
DPV	deionizovaná voda	$(1-100) \cdot 10^{-6}$	$4,6 \cdot 10^{-7}$
	pitná voda	$(1-100) \cdot 10^{-6}$	$4,6 \cdot 10^{-7}$
	říční voda	$(1-100) \cdot 10^{-6}$	$6,0 \cdot 10^{-7}$
DPV po	deionizovaná voda	$(1-10) \cdot 10^{-7}$	$1,9 \cdot 10^{-7}$
SPE 100→10 ml	pitná voda	$(1-10) \cdot 10^{-7}$	$2,2 \cdot 10^{-7}$
	říční voda	$(1-10) \cdot 10^{-7}$	$2,1 \cdot 10^{-7}$
DPV po	deionizovaná voda	$(1-10) \cdot 10^{-8}$	$1,4 \cdot 10^{-8}$
SPE 100→1 ml	pitná voda	$(1-10) \cdot 10^{-8}$	$1,1 \cdot 10^{-8}$
	říční voda	$(1-10) \cdot 10^{-8}$	$1,0 \cdot 10^{-8}$

## 7 LITERATURA

1. [http://www.pentachemicals.eu/bezp\\_listy/n/bezplist\\_518.pdf](http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/n/bezplist_518.pdf), staženo 18. dubna 2013.
2. <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad20.pdf>, staženo 20. dubna 2013.
3. <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp50.pdf>, staženo 20. dubna 2013.
4. Tapsoba I., Bourhis S., Feng T., Pontie M.: Sensitive and selective electrochemical analysis of methyl-parathion (MPT) and 4-nitrophenol (PNP) by a new type p-NiTSPc/p-PPD coated carbon fiber microelectrode (CFME). *Electroanalysis*, 21, 1167-1176 (2009).
5. Šmejkalová H.: Voltametrické stanovení 4-nitrofenolu na velkoplošné uhlíkové filmové elektrodě. *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2011.
6. Niazi A., Yazdanipour A.: Spectrophotometric simultaneous determination of nitrophenol isomers by orthogonal signal correction and partial least squares. *Journal of Hazardous Materials*, 146, 421-427 (2007).
7. Zhang W., Wilson C. R., Danielson N. D.: Indirect fluorescent determination of selected nitro-aromatic and pharmaceutical compounds via UV-photolysis of 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonate. *Talanta*, 74, 1400-1407 (2008).
8. Padilla-Sanchez J. A., Plaza-Bolanos P., Romero-Gonzalez R., Garrido-Frenich A., Vidal J. L. M.: Application of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe-based method for the simultaneous extraction of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in agricultural soils, analyzed by using gas chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 5724-5731 (2010).
9. Guo X. F., Wang Z. H., Zhou S. P.: The separation and determination of nitrophenol isomers by high-performance capillary zone electrophoresis. *Talanta*, 64, 135-139 (2004).
10. Hofmann D., Hartmann F., Herrmann H.: Analysis of nitrophenols in cloud water with a miniaturized light-phase rotary perforator and HPLC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 161-169 (2008).



11. Rounaghi G., Kakhki R. M., Azizi-Toupkanloo H.: Voltammetric determination of 4-nitrophenol using a modified carbon paste electrode based on a new synthetic crown ether/silver nanoparticles. *Materials Science & Engineering C – Materials for Biological Applications*, 32, 172-177 (2012).
12. Daňhel A.: Novel silver amalgam electrodes in electroanalysis of selected agrochemicals. *Disertační práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2011.
13. Barek J., Ebertova H., Mejstrik V., Zima J.: Determination of 2-nitrophenol, 4-nitrophenol, 2-methoxy-5-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol by differential-pulse voltammetry and adsorptive stripping voltammetry. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 59, 1761-1771 (1994).
14. Svancara I., Vytras K., Barek J., Zima J.: Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31, 311-345 (2001).
15. Zima J., Svancara I., Barek J., Vytras K.: Recent advances in electroanalysis of organic compounds at carbon paste electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39, 204-227 (2009).
16. Svancara I., Zima J.: Possibilities and limitations of carbon paste electrodes in organic electrochemistry. *Current Organic Chemistry*, 15, 3043-3058 (2011).
17. Li J. H., Kuang D. Z., Feng Y. L., Zhang F. X., Xu Z. F., Liu M. Q.: A graphene oxide-based electrochemical sensor for sensitive determination of 4-nitrophenol. *Journal of Hazardous Materials*, 201, 250-259 (2012).
18. Yin H. S., Zhou Y. L., Ai S. Y., Ma Q., Zhu L. S., Lu L. A.: Electrochemical oxidation determination and voltammetric behaviour of 4-nitrophenol based on Cu<sub>2</sub>O nanoparticles modified glassy carbon electrode. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 92, 742-754 (2012).
19. Liu Z. N., Zhang H. C., Ma H. Y., Hou S. F.: Selective determination of p-nitrophenol based on its unique voltammetric behavior on nanoporous gold. *Electroanalysis*, 23, 2851-2861 (2011).
20. Deng P. H., Xu Z. F., Feng Y. L., Li J. H.: Electrocatalytic reduction and determination of p-nitrophenol on acetylene black paste electrode coated with salicylaldehyde-modified chitosan. *Sensors and Actuators B – Chemical*, 168, 381-389 (2012).

21. Asadpour-Zeynali K., Soheili-Azad P.: Simultaneous polarographic determination of 2-nitrophenol and 4-nitrophenol by differential pulse polarography method and support vector regression. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 1089-1096 (2012).
22. Yang Y. L., Unnikrishnan B., Chen S. M.: Amperometric determination of 4-nitrophenol at multi-walled carbon nanotube-poly(diphenylamine) composite modified glassy carbon electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 6, 3902-3912 (2011).
23. Zhang W. B., Chang J. L., Chen J. H., Xu F., Wang F., Jiang K., Gao Z. Y.: Graphene-Au composite sensor for electrochemical detection of para-nitrophenol. *Research on Chemical Intermediates*, 38, 2443-2455 (2012).
24. Wang J.: *Analytical Electrochemistry*. John Wiley, 3. vydání, Hoboken 2006.
25. Barek J., Peckova K., Vyskocil V.: Where modern electroanalytical methods verge fifty years after Nobel prize for polarography. *Chemické Listy*, 103, 889-893 (2009).
26. Bard A. J., Faulkner L. R.: *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley, New York 2001.
27. Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J.: Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds. *Electroanalysis*, 19, 2003-2014 (2007).
28. Heyrovsky M.: Polarography – past, present, and future. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 15, 1799-1803 (2011).
29. Peckova K., Barek J.: Boron doped diamond microelectrodes and microelectrode arrays in organic electrochemistry. *Current Organic Chemistry*, 15, 3014-3028 (2011).
30. Fischer A. E., Show Y., Swain G. M.: Electrochemical performance of diamond thin-film electrodes from different commercial sources. *Analytical Chemistry*, 76, 2553-2560 (2004).
31. Tallman D. E., Petersen S. L.: Composite electrodes for electroanalysis – principles and applications. *Electroanalysis*, 2, 499-510 (1990).

32. Walcarius A., Mandler D., Cox J. A., Collinson M., Lev O.: Exciting new directions in the intersection of functionalized sol-gel materials with electrochemistry. *Journal of Materials Chemistry*, 15, 3663-3689 (2005).
33. Navratil T., Barek J.: Analytical applications of composite solid electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39, 131-147 (2009).
34. Navratil T.: Composite solid electrodes – tool for organic electrochemistry. *Current Organic Chemistry*, 15, 2996-3013 (2011).
35. Brett C. M. A., Brett M. O.: *Electrochemistry, Principles, Methods and Applications*. Oxford University Press, Oxford 1994.
36. Zhao Q., Gan Z. H., Zhuang Q. K.: Electrochemical sensors based on carbon nanotubes. *Electroanalysis*, 14, 1609-1613 (2002).
37. Palecek E., Fojta M., Tomschik M., Wang J.: Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. *Biosensors and Bioelectronics*, 13, 621-628 (1998).
38. Renedo O. D., Alonso-Lomillo M. A., Martinez M. J. A.: Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73, 202-219 (2007).
39. Yosypchuk B., Barek J., Fojta M.: Carbon powder based films on traditional solid electrodes as an alternative to disposable electrodes. *Electroanalysis*, 18, 1126-1130 (2006).
40. Jiránek I., Barek J.: *Book of Proceedings – 4<sup>th</sup> International Student Conference: Modern Analytical Chemistry 2008, Prague, Czech Republic* (Opekar F., Svobodová E., eds), str. 153-157. Jiří G. K. Ševčík – Consultancy 2008.
41. Radová J.: Voltametrické stanovení protinádorového léčiva flutamidu a jeho metabolitu 4-nitro-3-trifluormethylanilinu. *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2010.
42. Beilby A. L., Carlsson A.: A pyrolytic carbon-film electrode for voltammetry. 5. Characterization and comparison with the glassy-carbon electrode by electrochemical pretreatment in basic solution. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 248, 283-304 (1988).

43. Lundstrom K.: A pyrolytic carbon-film electrode for voltammetry. 1. Preparation and general characterization. *Analytica Chimica Acta*, 146, 97-108 (1983).
44. Lundstrom K.: A pyrolytic carbon-film electrode for voltammetry. 2. Oxidative differential pulse voltammetry of selected organic-molecules. *Analytica Chimica Acta*, 146, 109-115 (1983).
45. Gustavsson I., Lundstrom K.: A pyrolytic carbon-film electrode for voltammetry. 3. Application to anodic-stripping voltammetry. *Talanta*, 30, 959-962 (1983).
46. Urbaniczky C., Lundstrom K.: A pyrolytic carbon-film electrode for voltammetry. 4. Residual current characterization. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 157, 221-231 (1983).
47. Blaedel W. J., Mabbott G. A.: Pyrolytic carbon-film electrode. *Analytical Chemistry*, 50, 933-936 (1978).
48. Gustavsson I., Lundstrom K.: Evaluation of a pyrolytic carbon-film electrode for differential pulse anodic-stripping voltammetry. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie*, 317, 388-388 (1984).
49. Beilby A. L., Lawrence G. L., Brooks W.: Comparison of pyrolytic carbon film electrode with wax-impregnated graphite electrode. *Analytical Chemistry*, 36, 22-26 (1964).
50. Hadi M., Rouhollahi A., Taïdy F., Yousefi M.: Cyclic voltammetric studies of a pyrolytic carbon film electrode and the effect of laser irradiation. *Electroanalysis*, 19, 668-673 (2007).
51. Hadi M., Rouhollahi A., Yousefi M., Taïdy F., Matekfar R.: Electrochemical characterization of a pyrolytic carbon film electrode and the effect of anodization. *Electroanalysis*, 18, 787-792 (2006).
52. Hadi M., Rouhollahi A.: Simultaneous electrochemical sensing of ascorbic acid, dopamine and uric acid at anodized nanocrystalline graphite-like pyrolytic carbon film electrode. *Analytica Chimica Acta*, 721, 55-60 (2012).
53. Nadi M., Rouhollahi A.: Application of nanocrystalline graphite-like pyrolytic carbon film electrode for determination of thiols. *Electrochimica Acta*, 58, 647-653 (2011).

54. Hadi M., Rouhollahi A., Yousefi M.: Application of nanocrystalline graphite-like pyrolytic carbon film electrode for voltammetric sensing of lead. *Journal of Applied Electrochemistry*, 42, 179-187 (2012).
55. Hadi M., Rouhollahi A., Yousefi M.: Nanocrystalline graphite-like pyrolytic carbon film electrode for electrochemical sensing of hydrazine. *Sensors and Actuators B – Chemical*, 160, 121-128 (2011).
56. Hadi M., Rouhollahi A., Yousefi M.: Direct electrooxidation of ascorbic acid at the nanocrystalline graphite-like pyrolytic carbon film electrode. *Electroanalysis*, 23, 1497-1505 (2011).
57. Zhao H. X., Liu A. P., Qiu X., Shen G. X.: Oxidation behavior of glucose on platinized diamond-like carbon film electrode. *Journal of Inorganic Materials*, 25, 1325-1329 (2010).
58. Wang Z. H., Li Z. G., Zhou S. P.: Voltammetric behavior of embedded super-thin carbon film electrode and its application. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 33, 523-526 (2005).
59. Rojo A., Rosenstratten A., Anjo D.: Characterization of a conductive carbon-film electrode for voltammetry. *Analytical Chemistry*, 58, 2988-2991 (1986).
60. Jirimali H. D., Nagarale R. K., Saravanakumar D., Lee J. M., Shin W.: Hydroquinone modified chitosan/carbon film electrode for the selective detection of ascorbic acid. *Carbohydrate Polymers*, 92, 641-644 (2013).
61. You T. Y., Niwa O., Chen Z. L., Hayashi K., Tomita M., Hirono S.: An amperometric detector formed of highly dispersed Ni nanoparticles embedded in a graphite-like carbon film electrode for sugar determination. *Analytical Chemistry*, 75, 5191-5196 (2003).
62. You T. Y., Niwa O., Tomita M., Hirono S.: Characterization of platinum nanoparticle-embedded carbon film electrode and its detection of hydrogen peroxide. *Analytical Chemistry*, 75, 2080-2085 (2003).
63. Anjo D. M., Brown S., Wang L.: Performance evaluation of an easily prepared optically transparent carbon-film electrode. *Analytical Chemistry*, 65, 317-319 (1993).

64. Jiránek I., Rumlová T., Barek J.: *Modern Electrochemical Methods XXX, Jetřichovice, Czech Republic* (Navrátil T., Barek J., eds), str. 93-97. Best Servis 2010.
65. Vyskocil V., Barek J.: Voltammetric DNA biosensor based on a microcrystalline natural graphite–polystyrene composite transducer. *Procedia Chemistry*, 6, 52-59 (2012).
66. Ziyatdinova G., Labuda J.: Biosensor with protective membrane for the detection of DNA damage and antioxidant properties of fruit juices. *Electroanalysis*, 24, 2333-2340 (2012).
67. Khaskheli A. R., Fischer J., Barek J., Vyskocil V., Sirajuddin, Bhanger M. I.: Differential pulse voltammetric determination of paracetamol in tablet and urine samples at a micro-crystalline natural graphite–polystyrene composite film modified electrode. *Electrochimica Acta*, publikováno online (DOI: 10.1016/j.electacta.2012.1009.1102) (2013).
68. <http://www.metrohm.com/com/Produkte2/Electrodes/VASolidStateWorking.html>, staženo 18. dubna 2013.
69. Rumlová T.: Voltametrické stanovení 5-nitrochinolinu na uhlíkové filmové elektrodě. *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2009.
70. Fařarová M.: Voltammetric determination of DNA damage caused by genotoxic 2-aminofluorene at a carbon film electrode. *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2011.
71. Matthias O.: *Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
72. Miller J. N., Miller J. C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Pearson Education, 5. vydání, Harlow 2005.
73. Pontie M., Thouand G., De Nardi F., Tapsoba I., Lherbette S.: Antipassivating electrochemical process of glassy carbon electrode (GCE) dedicated to the oxidation of nitrophenol compounds. *Electroanalysis*, 23, 1579-1584 (2011).
74. Plzák Z.: *Detekční schopnost analytické metody, mez detekce, mez stanovitelnosti*. Eurachem, metodický list 7, Praha 2011.
75. Merck: *ChromBook 2008/2009*. Merck, Darmstadt 2008.

76. Fischer J., Vanourkova L., Danhel A., Vyskocil V., Cizek K., Barek J., Peckova K., Yosypchuk B., Navratil T.: Voltammetric determination of nitrophenols at a silver solid amalgam electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 2, 226-234 (2007).
77. Musilova J., Barek J., Peckova K.: Determination of nitrophenols in drinking and river water by differential pulse voltammetry at boron-doped diamond film electrode. *Electroanalysis*, 23, 1236-1244 (2011).
78. Chen L. G., Wang H., Zeng Q. L., Xu Y., Sun L., Xu H. Y., Ding L.: On-line coupling of solid-phase extraction to liquid chromatography – a review. *Journal of Chromatographic Science*, 47, 614-623 (2009).
79. El-Sheikh A. H., Al-Jafari M. K., Sweileh J. A.: Solid phase extraction and uptake properties of multi-walled carbon nanotubes of different dimensions towards some nitro-phenols and chloro-phenols from water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 92, 190-209 (2012).
80. Masque N., Galia M., Marce R. M., Borrull F.: Solid-phase extraction of phenols and pesticides in water with a modified polymeric resin. *Analyst*, 122, 425-428 (1997).
81. Olujimi O. O., Fatoki O. S., Odendaal J., Okonkwo O. J.: Solid-phase extraction method for the analysis of eleven phenolic pollutants in water samples. *Asian Journal of Chemistry*, 23, 657-662 (2011).
82. Wang T. Y., Chen G. L., Hsu C. C., Vied S., Conte E. D., Suen S. Y.: Octadecyltrimethylammonium surfactant-immobilized cation exchange membranes for solid-phase extraction of phenolic compounds. *Microchemical Journal*, 96, 290-295 (2010).
83. Zhu S. Y., Niu W. X., Li H. J., Han S., Xu G. B.: Single-walled carbon nanohorn as new solid-phase extraction adsorbent for determination of 4-nitrophenol in water sample. *Talanta*, 79, 1441-1445 (2009).
84. Ali I., Gupta V. K., Saini V. K., Aboul-Enein H. Y.: Analysis of phenols in wastewater using capillary electrophoresis and solid phase extraction. *International Journal of Environment and Pollution*, 27, 95-103 (2006).

85. Pastor F. T., Dejmeková H., Zima J., Barek J.: Determination of chloramphenicol by differential pulse voltammetry at carbon paste electrodes – the use of sodium sulfite for removal of oxygen from electrode surface. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 76, 383-397 (2011).
86. <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/7.0.html>, staženo 1. dubna 2013.
87. Boateng A., Brajter-Toth A.: Nanomolar detection of *p*-nitrophenol via *in situ* generation of *p*-aminophenol at nanostructured microelectrodes. *Analyst*, 137, 4531-4538 (2012).
88. Vyskocil V., Barek J.: Electroanalysis of nitro and amino derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Organic Chemistry*, 15, 3059-3076 (2011).